

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THALITA BASTIDA VIEIRA

EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS EM *Aedes (Stegomyia) aegypti*
(LINNAEUS, 1762) (DIPTERA: CULICIDAE) EXPOSTOS A ANTIMÔNIO E
BUTIL BENZIL FTALATO

CURITIBA

2019

THALITA BASTIDA VIEIRA

EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS EM *Aedes (Stegomyia) aegypti*
(LINNAEUS, 1762) (DIPTERA: CULICIDAE) EXPOSTOS A ANTIMÔNIO E
BUTIL BENZIL FTALATO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas Área de Concentração Entomologia, Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Navarro da Silva

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Vieira, Thalita Bastida

Efeitos ecotoxicológicos em *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) expostos a antimônio e butil benzil ftalato. / Thalita Bastida Vieira. – Curitiba, 2019.

141 p. : il.

Orientador: Mário Antônio Navarro da Silva

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Entomologia

1. *Aedes aegypti*. 2. Genotoxicidade. 3. Antimônio. 4. Resíduos. I. Título II. Silva, Mário Antônio Navarro da. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Entomologia.

CDD (22. ed.) 595.772



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ENTOMOLOGIA) - 40001016005P5

TERMO DE APROVAÇÃO

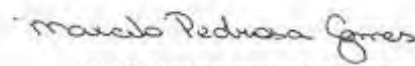
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ENTOMOLOGIA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **THALITA BASTIDA VIEIRA** intitulada: **Efeitos ecotoxicológicos em *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) expostos a antimônio e butil benzil ftalato**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

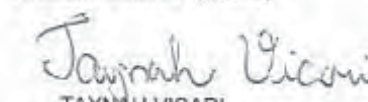
A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Fevereiro de 2019.


MÁRIO ANTONIO NAVARRO DA SILVA
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


VINICIUS SOBRINHO RICHARDI
Avaliador Externo (UFPR)


MARCELO PEDROSA GOMES
Avaliador Externo (UQAM)


TAYNAH VICARI
Avaliador Externo (UFPR)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador professor Dr. Mário Antônio Navarro da Silva pelas oportunidades oferecidas, acolhimento no laboratório, bons conselhos e conversas, ajudas, ensinamentos, orientação, e por acreditar e confiar em mim nesses 6 anos em que estou no laboratório. Por nos ensinar que devemos devolver à sociedade o investimento feito em nós durante a vida acadêmica, e por incentivar seus orientados, principalmente as mulheres, a lutar pelo nosso lugar na ciência.

Ao Dr. Vinicius Sobrinho Richardi, à Dra. Taynah Vicari e ao Dr. Marcelo Pedrosa Gomes por aceitarem ser minha banca examinadora e contribuir para o enriquecimento da tese.

Ao Prof. Dr. Marco Tadeu Grassi e ao Grupo de Química Ambiental da Universidade Federal do Paraná, em especial à Loana M. Baika pela realização da quantificação química do antimônio e ao Rafael Garrett Dolatto pelas diversas tentativas da quantificação do ftalato.

Ao Dr. Gustavo Souza Santos do Laboratório de Mutagênese Ambiental e Citogenética Animal (UFPR) pela realização dos ensaios cometa alcalino.

À prof. Dra. Helena Cristina Silva de Assis e à Maiara Vicentini do Laboratório de Toxicologia Ambiental (UFPR) por abrirem as portas do laboratório para que eu pudesse realizar os ensaios enzimáticos.

À Dra. Gisele Moraes, Emily Nentwig e Mariana Perez por me ajudarem ativamente nos ensaios de toxicidade e enzimático, pelas idas à farmácia me socorrendo por ter esquecido algum material, pelas mãos doloridas na filtragem da água e pela manutenção da colônia.

À Universidade Federal do Paraná pela infraestrutura, possibilitando a execução do trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia e aos professores, pelos ensinamentos e contribuições para a minha formação profissional e pessoal.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de doutorado.

Aos amigos e colegas do Programa de Pós-Graduação em Entomologia que de alguma forma contribuíram nessa jornada. Meu carinho e agradecimento especial a Gisele, Betina, Vinicius, João, Maycon, Lucas, Silvana, Mafer e Camila. A convivência com alguns de vocês rompeu (e muito!) os portões da universidade, e ter a companhia de vocês foi muito importante pra mim nesses seis anos de UFPR. Sei que não para por aqui. Obrigada!!!

Aos colegas e amigos do Laboratório de Morfologia e Fisiologia de Culicidae e Chironomidae, os que ainda estão, ou que já se foram, em especial Gisele Moraes, Mariana Perez, Emily Nentwig, Vinicius Richardi, Betina Westphal Ferreira, Tatiana Rocha, Debora Rebechi e Camila Santos, que além de toda a ajuda profissional, foram companheiros de vida. Vocês não tem ideia do quanto me fizeram aprender e crescer nesses anos de convivência. Afinal, a gente faz amigos na pós-graduação sim! Vocês são maravilhosos!!

Aos amigos e amigas dos meus vários grupinhos diferentes, em especial aos meus queridos e queridas de São José, da faculdade e das “convenções”. Não vou citar nomes, porque vocês sabem quem vocês são. Obrigada pela amizade, companheirismo, cuidado, consolos, pelos debates, discussões, poucos choros e muitas risadas, e por não me deixarem esquecer do meu papel na natureza, na ciência, na sociedade, e principalmente por me darem o suporte emocional para a conclusão desta fase. Tenho algumas certezas na vida, e a de que estaremos juntos em todas as outras fases que virão é uma delas!! Amo vocês!

A toda minha família de São José, Maringá e Ourizona, em especial às minhas vózinhas que são luz, uma no céu, e uma na terra!

Aos meus pais, Dilor e Cleidenir, e à minha irmã Mariana, por me darem todo o suporte e apoio necessário durante o doutoramento, e em toda a minha vida. Por entenderem as ausências, o mau humor, as noites em claro, pelos consolos e por me dar força. Pai e mãe, obrigada por não medirem esforços para que eu pudesse realizar meus planos e sonhos! Amo vocês!

A Deus! Por tudo, mas principalmente por me dar força quando eu já não tinha!

Com carinho!

Thali :)

*"It is good to have an end to journey toward; but
is the journey that matters, in the end."*

Ursula K. Le Guin

RESUMO

O avanço da atividade industrial e agrícola, associado ao distanciamento de práticas de exploração equilibrada dos recursos naturais, têm gerado resíduos tóxicos excedentes, como os compostos de antimônio (Sb) e o butil benzil ftalato (BBP). Os estudos analisando o impacto destes xenobióticos sobre as espécies aquáticas estão atraindo grande interesse, assim como o uso de *Aedes aegypti* como modelo biológico, graças a fatores como facilidade de criação em laboratório, ciclo de vida curto, amplo conhecimento da biologia, fisiologia e capacidade vetorial. O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos genotóxicos, bioquímicos, na morfologia e nos parâmetros biológicos em *A. aegypti* em exposição a antimônio e butil benzil ftalato. Populações de laboratório e de campo foram submetidas a seis concentrações de BBP variando de 0,001 mg.L⁻¹ a 2,0 mg.L⁻¹ em exposição aguda (48h), e às concentrações 0,001 mg.L⁻¹, 0,1 mg.L⁻¹ e 1,0 mg.L⁻¹ em exposições subcrônica (cinco dias) e crônica (15 dias). As larvas foram submetidas a cinco concentrações de Sb de 0,005 mg.L⁻¹ a 1,5 mg.L⁻¹ em exposição aguda, e às concentrações 0,005 mg.L⁻¹, 0,05 mg.L⁻¹ e 0,5 mg.L⁻¹ em exposições subcrônica e crônica. Para ambos os tóxicos foram realizados ensaios cometa a fim de verificar os danos ao DNA e ensaios de atividade enzimática de acetilcolinesterase (AChE), esterases (EST- α e EST- β), glutationa S-transferase (GST), superóxido-dismutase (SOD) e catalase (CAT) e de danos de peroxidação lipídica (LPO) para analisar as alterações bioquímicas. Como parâmetros biológicos foram avaliados sobrevivência, tempo de desenvolvimento, taxa de emergência de machos e fêmeas e razão sexual. Somente para BBP foi avaliado o tamanho da asa e somente para Sb foi determinada a quantificação real do produto na água pelo método de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado. O BBP provocou danos ao DNA em todas as populações e tempos de exposição. A atividade da AChE e da EST- α foi induzida na população de campo. EST- β e GST tiveram aumento da atividade em exposição aguda e não alteração em exposição crônica na população de campo. Na população de laboratório, houve redução da EST- β em agudo e aumento em crônico, e respostas inversamente proporcionais para GST. CAT, SOD e LPO sofreram alterações, porém não foram respostas similares, embora estejam relacionadas. Nos parâmetros biológicos, houve aumento do tamanho da asa de fêmeas expostas à concentração 0,001 mg.L⁻¹; redução na quantidade de larvas L1 que chegaram ao estágio L4 e de adultos; na população de campo ocorreu antecipação do estágio de pupa e emergência dos adultos associado a maior duração do tempo de desenvolvimento e razão sexual positiva para machos. Na população de laboratório, a maior taxa de emergência foi após 10 a 12 dias de eclosão das larvas, a razão sexual foi maior para os machos, e fêmeas na concentração 0,1 mg.L⁻¹ emergiram antes dos machos. O antimônio provocou danos ao DNA em exposição crônica e, em exposição aguda somente na concentração 1,5 mg.L⁻¹. Não houve alteração na atividade da AChE. Apenas na concentração 1,0 mg.L⁻¹ na população de campo em exposição aguda ocorreu ativação das enzimas de biotransformação de fases I e II não sendo observada toxicidade nos demais tratamentos, populações e tempos de exposição. SOD, CAT e danos de LPO evidenciaram alterações na via de defesa ao estresse oxidativo. Nos dados obtidos sobre os parâmetros biológicos, o ciclo de vida foi mais longo na população de laboratório, a razão sexual foi positiva para as fêmeas em todas as exposições na população de campo e no controle solvente e na maior concentração na população de campo. Os resultados indicam que BBP e Sb podem provocar alterações positivas e negativas no desenvolvimento de *Aedes aegypti* em diversos níveis de organização biológica, de celular à populacional.

Palavras-chave: desenvolvimento; ensaio enzimático; danos ao DNA; biologia.

ABSTRACT

The advance of industrial and agricultural activity, associated with the distancing of practices of balanced exploitation of natural resources, have produced excess toxic residues, such as antimony compounds and butyl benzyl phthalate. Studies analyzing the impact of these xenobiotics on aquatic species are attracting great interest, as well as the use of *Aedes aegypti* as a biological model, related to factors such as easy creation of animals in the laboratory, short life cycle, knowledge of biology, physiology and vector capacity. This study aims to evaluate the genotoxic and biochemical effects, morphology and biological parameters in *A. aegypti* on exposure to antimony (Sb) and butyl benzyl phthalate (BBP). Laboratory and field populations were submitted to six concentrations of BBP ranging from 0.001 mg.L⁻¹ to 2.0 mg.L⁻¹ in acute exposure (48 h), and at concentrations of 0.001 mg.L⁻¹, 0.1 mg.L⁻¹ and 1.0 mg.L⁻¹ in subchronic (five days) and chronic (15 days) exposures. The larvae were submitted to five concentrations of antimony varying from 0.005 mg.L⁻¹ to 1.5 mg.L⁻¹ in acute exposure, and at concentrations of 0.005 mg.L⁻¹, 0.05 mg.L⁻¹ and 0.5 mg.L⁻¹ in sub-chronic and chronic exposures, compared to water and solvent controls. For both toxic comet assays were performed to verify DNA damage and enzymes activity assay to acetylcholinesterase (AChE), esterases (EST- α and EST- β), glutathione S-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), and lipid peroxidation damage (LPO) to analyze metabolic changes. Survival, development time, the rate of emergence of males and females and sexual ratio were evaluated as biological parameters. Only for BBP the wing size was evaluated and only for Sb the real quantification by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry was determined. BBP caused DNA damage in all populations and times of exposure. The activity of AChE and EST- α was induced in the field population. EST- β and GST had increased activity on acute exposure and no change in chronic exposure in the field population. In the laboratory population, there was a reduction of EST- β in acute and increase in chronic and inversely proportional responses to GST. CAT, SOD, and LPO suffered alterations, but were not similar responses, although they are related. In the biological parameters, there was an increase in the wing size of females exposed to the concentration of 0.001 mg.L⁻¹; reduction in the number of L1 larvae that reached stage L4 and adults. In the field population there was an anticipation of pupa stage and emergence of adults associated with longer duration of development and positive sex ratio for males. In the laboratory population, the highest emergency rate was after 10-12 days of larval hatching, the sex ratio was higher for males, and females at concentration 0.1 mg.L⁻¹ emerged before males. The antimony caused damage to the DNA on chronic exposure and, in acute exposure only at the concentration of 1.5 mg.L⁻¹. There was no change in AChE activity. Only in the concentration 1.0 mg.L⁻¹ in the field population in acute exposure there was activation of the biotransformation enzymes of phases I and II and no toxicity was observed in the other treatments, populations and exposure times. SOD, CAT and LPO evidenced alterations in the defense pathway to oxidative stress. In the data obtained on biological parameters, the life cycle was longer in the laboratory population, the sex ratio was positive for females at all exposures in the field population, in solvent control and in the highest concentration in the field population. The results indicate that both BBP and Sb can cause changes in the development of *A. aegypti* at various levels of biological organization, from cellular to the populational.

Keywords: development; enzymatic assay; DNA damage; biology.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Fluxograma das atividades realizadas nos ensaios de toxicidade ao butil benzil ftalato. 44

Figura 2. Mapa do estado do Paraná com destaque para a localização do município de Londrina (em vermelho). Fonte: ITCG (2010). 45

Figura 3. A. Ovitrapa com palheta de madeira para oviposição de *A. aegypti*; B. Gaiolas de criação; C. Recipiente para oviposição no interior das gaiolas; D. Papel filtro com ovos de fêmeas de *A. aegypti* após realização do repasto sanguíneo. . 46

Figura 4. Asa de *A. aegypti* digitalizada indicando a posição dos 14 marcos anatômicos (LM) utilizados. 55

Figura 5. Porcentagem média de mortalidade de larvas de *A. aegypti* em exposição a concentrações nominais de BBP (em mg.L⁻¹) e grupos controles água (CA) e solvente (CS). (A) Exposição aguda (48h) em larvas de campo; (B) Exposição aguda (48h) em larvas de laboratório (ANOVA Kruskal-Wallis com pós-teste de Tukey's; p<0,05). 56

Figura 6. Escore de danos ao DNA em larvas de *A. aegypti* em exposições aguda (48h) e subcrônica (5 dias) a concentrações nominais de BBP (em mg.L⁻¹) e grupos controles água (CA) e solvente (CS) (n=10), indicando mediana, primeiro quartil, terceiro quartil, mínimo e máximo. (A) Exposição aguda em larvas de campo; (B) Exposição aguda em larvas de laboratório; (C) Exposição subcrônica em larvas de campo; os grupos controles água e solvente são estatisticamente diferentes; (D) Exposição subcrônica em larvas de laboratório. Asteriscos representam diferença significativa entre os grupos controles água ou solvente e os tratamentos (ANOVA Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunnett; p<0,05). 57

Figura 7. Média e desvio padrão da atividade das enzimas (A) AChE, (B) EST- α , (C) EST- β , (D) GST, (E) CAT, (F) SOD e (G) quantidade de hidroperóxido (LPO) em larvas de campo de *A. aegypti* após exposição aguda (48h) a concentrações nominais de BBP (em mg.L⁻¹) e grupos controles água (CA) e solvente (CS). Letras diferentes indicam alterações significativas (ANOVA com pós-teste de Tukey's; p<0,05). 60

Figura 8. Média e desvio padrão da atividade das enzimas (A) AChE, (B) EST- α , (C) EST- β , (D) GST, (E) CAT, (F) SOD e (G) quantidade de hidroperóxido (LPO) em larvas de laboratório de *A. aegypti* após exposição aguda (48h) a concentrações nominais de BBP (em mg.L⁻¹) e grupos controles água (CA) e solvente (CS). Letras diferentes indicam alterações significativas (ANOVA com pós-teste de Tukey's; p<0,05). 61

Figura 9. Média e desvio padrão da atividade das enzimas (A) AChE, (B) EST- α , (C) EST- β , (D) GST, (E) CAT, (F) SOD e (G) quantidade de hidroperóxido (LPO) em larvas de campo de *A. aegypti* após exposição subcrônica (5 d) a concentrações nominais de BBP (em mg.L⁻¹) e grupos controles água (CA) e solvente (CS). Letras

diferentes indicam alterações significativas (ANOVA com pós-teste de Tukey's; $p < 0,05$). 62

Figura 10. Média e desvio padrão da atividade das enzimas (A) AChE, (B) EST- α , (C) Est- β , (D) GST, (E) CAT, (F) SOD e (G) quantidade de hidroperóxido (LPO) em larvas de laboratório de *A. aegypti* após exposição subcrônica (5 d) a concentrações nominais de BBP (em mg.L^{-1}) e grupos controles água (CA) e solvente (CS). Letras diferentes indicam alterações significativas (ANOVA com pós-teste de Tukey's; $p < 0,05$). 63

Figura 11. Média do tamanho do centroide das asas direitas de machos e fêmeas de *A. aegypti* da população de campo após exposição crônica a concentrações nominais de BBP (em mg.L^{-1}) e grupos controles água (CA) e solvente (CS). Letras diferentes indicam alterações significativas (ANOVA com pós-teste de Tukey's; $p < 0,05$). 64

Figura 12. Percentual médio de sobrevivência de larvas e emergência de adultos de *A. aegypti* em exposição a concentrações nominais de BBP (em mg.L^{-1}) e grupos controles água (CA) e solvente (CS). (A) Larvas de campo; (B) Larvas de laboratório; (-○-) Taxa de desenvolvimento de larvas L1 a L4 em exposição subcrônica; (-Δ-) Taxa de desenvolvimento de larvas L4 a adultos em exposição crônica (ANOVA Kruskal-Wallis com pós-teste de Tukey's; $p < 0,05$). 65

Figura 13. Média e desvio padrão do início da emergência (em dias) de pupas e adultos machos e fêmeas de *A. aegypti* após exposição crônica (15 dias) a concentrações nominais de BBP (em mg.L^{-1}) e grupos controles água (CA) e solvente (CS). (A) Exposição crônica em amostras de campo; (B) Exposição crônica em amostras de laboratório. 65

Figura 14. Média e desvio padrão da emergência (em dias) de adultos de *A. aegypti* após exposição crônica (15 dias) a concentrações nominais de BBP (em mg.L^{-1}) e grupos controles água (CA) e solvente (CS). (A) Exposição crônica em amostras de campo; (B) Exposição crônica em amostras de laboratório. 66

CAPÍTULO II

Figura 15. Fluxograma das atividades realizadas nos ensaios de toxicidade ao antimônio. 89

Figura 16. Porcentagem média de mortalidade de larvas de *A. aegypti* em exposição a concentrações nominais de antimônio (mg.L^{-1}) e grupos controles água (CA) e solvente (CS). (A) Exposição aguda em larvas de campo; (B) Exposição aguda em larvas de laboratório; (C) Exposição subcrônica em larvas de campo; (D) Exposição subcrônica em larvas de laboratório. 100

Figura 17. Escore de danos ao DNA em larvas de *A. aegypti* em exposições aguda (48 horas) e subcrônica (5 dias) a concentrações nominais de Sb (em mg.L^{-1}) e grupos controles água (CA) e solvente (CS) ($n=10$), indicando mediana, primeiro quartil, terceiro quartil, mínimo e máximo. (A) Exposição aguda em larvas de campo; (B) Exposição aguda em larvas de laboratório; (C) Exposição subcrônica em larvas de campo; (D) Exposição subcrônica em larvas de laboratório. Asteriscos

representam diferença significativa entre os grupos controles água ou solvente e os tratamentos (ANOVA Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunnett; $p < 0,05$). 101

Figura 18. Média e desvio padrão da atividade das enzimas (A) AChE, (B) Est- α , (C) Est- β , (D) GST, (E) CAT, (F) SOD e (G) quantidade de hidroperóxido (LPO) em larvas de campo de *A. aegypti* após exposição aguda (48h) a concentrações de Sb e grupos controles água (CA) e solvente (CS). Letras diferentes indicam alterações significativas (ANOVA com α com pós-teste de Tukey's; $p < 0,05$). 104

Figura 19. Média e desvio padrão da atividade das enzimas (A) AChE, (B) Est- α , (C) Est- β , (D) GST, (E) CAT, (F) SOD e (G) quantidade de hidroperóxido (LPO) em larvas de laboratório de *A. aegypti* após exposição aguda (48h) a concentrações de Sb e grupos controles água (CA) e solvente (CS). Letras diferentes indicam alterações significativas (ANOVA com pós-teste de Tukey's; $p < 0,05$). 105

Figura 20. Média e desvio padrão da atividade das enzimas (A) AChE, (B) Est- α , (C) Est- β , (D) GST, (E) CAT, (F) SOD e (G) quantidade de hidroperóxido (LPO) em larvas de campo de *A. aegypti* após exposição subcrônica (5d) a concentrações de Sb e grupos controles água (CA) e solvente (CS). Letras diferentes indicam alterações significativas (ANOVA com α com pós-teste de Tukey's; $p < 0,05$). 106

Figura 21. Média e desvio padrão da atividade das enzimas (A) AChE, (B) Est- α , (C) Est- β , (D) GST, (E) CAT, (F) SOD e (G) quantidade de hidroperóxido (LPO) em larvas de laboratório de *A. aegypti* após exposição subcrônica (5d) a concentrações de Sb e grupos controles água (CA) e solvente (CS). Letras diferentes indicam alterações significativas (ANOVA com pós-teste de Tukey's; $p < 0,05$). 107

Figura 22. Percentual médio de sobrevivência de larvas e emergência de adultos de *A. aegypti* em exposição a concentrações nominais de Sb (em mg.L^{-1}) e grupos controles água (CA) e solvente (CS). (A) Larvas de campo; (B) Larvas de laboratório; (-○-) Taxa de desenvolvimento de larvas L1 a L4 em exposição subcrônica; (-Δ-) Taxa de desenvolvimento de larvas L4 a adultos em exposição crônica (ANOVA Kruskal-Wallis com pós-teste de Tukey's; $p < 0,05$). 109

Figura 23. Média e desvio padrão do início da emergência (em dias) de pupas e adultos machos e fêmeas de *A. aegypti* após exposição crônica (15 dias) a concentrações nominais de Sb (em mg.L^{-1}) e grupos controles água (CA) e solvente (CS). (A) Exposição crônica em amostras de campo; (B) Exposição crônica em amostras de laboratório. 109

Figura 24. Média e desvio padrão da emergência (em dias) de adultos de *A. aegypti* após exposição crônica (15 dias) a concentrações nominais de Sb (em mg.L^{-1}) e grupos controles água (CA) e solvente (CS). (A) Exposição crônica em amostras de campo; (B) Exposição crônica em amostras de laboratório. 110

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela I. Concentrações subletais de butil benzil ftalato e etanol absoluto (99,5%) utilizadas nos ensaios de toxicidade aguda com as populações de campo e de laboratório. CA = controle água; CS = controle solvente; Sol = solução de BBP preparada para o uso diário no ensaio. 48

Tabela II. Média dos parâmetros físico-químicos em período inicial e final do ensaio agudo em exposição a BBP nas populações de campo e de laboratório. TDS = produtos sólidos totais; DO = oxigênio dissolvido. 48

Tabela III. Concentrações subletais de butil benzil ftalato e etanol absoluto (99,5%) utilizadas nos ensaios de toxicidade subcrônica e crônica com as populações de campo e de laboratório. CA = controle água; CS = controle solvente; Sol = solução de BBP preparada para o uso diário no ensaio. 49

Tabela IV. Média dos parâmetros físico-químicos em período inicial e final do ensaio crônico em exposição a BBP nas populações de campo e de laboratório. TDS = produtos sólidos totais; DO = oxigênio dissolvido. 49

Tabela V. Número de larvas de laboratório e campo em exposições aguda e subcrônica utilizadas nos ensaios cometa. 50

Tabela VI. Descrição dos marcos anatômicos inseridos nos pontos de convergência e divergência das veias alares de *Aedes aegypti*, seguindo a nomenclatura morfológica de Forattini (1996). 54

Tabela VII. Percentual médio de machos e fêmeas emergidos e razão sexual das populações de campo e de laboratório de *A. aegypti* após exposição crônica (15 dias) a concentrações nominais de BBP (em mg.L⁻¹) e grupos controles água (CA) e solvente (CS). O símbolo (*) indica presença de diferenças significativas e o símbolo (-) indica ausência de diferenças significativas (Qui-quadrado; p<0,05). 67

CAPÍTULO II

Tabela VIII. Concentrações de antimônio e solvente HCl utilizadas nos ensaios de toxicidade aguda com as populações de campo e de laboratório. CA = controle água; CS = controle solvente; Sol = solução de ATO preparada para o uso diário no ensaio; * Limite máximo determinado pelo CONAMA 57 (2005). 92

Tabela IX. Média dos parâmetros físico-químicos em período inicial e final do ensaio crônico em exposição a BBP nas populações de campo e de laboratório. TDS = produtos sólidos totais; DO = oxigênio dissolvido. 92

Tabela X. Concentrações de antimônio e solvente HCl utilizadas nos ensaios de toxicidade crônica com as populações de campo e de laboratório. CA = controle

água; CS = controle solvente; Sol = solução de ATO preparada para o uso diário no ensaio. 93

Tabela XI. Média dos parâmetros físico-químicos em período inicial e final do ensaio crônico em exposição a BBP nas populações de campo e de laboratório. TDS = produtos sólidos totais; DO = oxigênio dissolvido. 93

Tabela XII. Número de larvas de laboratório e campo em exposições aguda e subcrônica utilizadas nos ensaios cometa. 95

Tabela XIII. Concentrações nominais e concentrações reais (em mg.L⁻¹) de antimônio em período inicial e final em populações de campo e de laboratório após exposições aguda (48 horas) e crônica (17 dias). O símbolo (-) indica ausência de diferenças significativas e o símbolo (*) indica diferença significativa entre as concentrações reais iniciais e finais (ANOVA Kruskal-Wallis com pós-teste de Tukey's; p<0,05). 100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE	Acetilcolinesterase
ANOVA	Análise de variância
ATC	Iodeto de acetiltiocolina
ATO	Trióxido de antimônio
BBP	Butil benzil ftalato
BHT	Hidroxitolueno butilato cristalino
BSA	Albumina Sérica Bovina
Bti	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CA	Controle água
CAT	Catalase
CEUA/BIO	Comissão de Ética no Uso de Animais - Setor de Ciências Biológicas
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CIT p450	Citocromo p450
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CS	Controle solvente
CVG	Geração química de vapor (<i>Chemical Vapor Generation</i>)
DBP	Dibutil ftalato
DEP	Dietil ftalato
DEHP	Di-(2-etilhexil) ftalato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Oxigênio dissolvido
DTNB	5,5-Ditio-bis-2nitro-benzoato
ECHA	Agência Europeia das Substâncias Químicas
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético

EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar
EST- α	Alfa-esterase
EST- β	Beta-esterase
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GSH	Glutathiona reduzida
GST	Glutathiona S-transferase
HCH	Hexaclorociclohexanos
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
ICP-OES	Espectrometria de Emissão Atômica com Fonte de Plasma
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
ITCG	Instituto de Terras, Cartografia e Geologia do Paraná
LAMFIC	Laboratório de Morfologia e Fisiologia de Culicidae e Chironomidae
LM	Marcos Anatômicos
LMP	Agarose de baixo ponto de ebulição
LPO	Peroxidação lipídica
PAE	Ftalato
PET	Tereftalato de polietileno
PBS	Tampão Fosfato salino
PTFE	Politetrafluoretileno
PTN	Proteína Total
PVC	Policloreto de vinila
SOD	Superóxido Dismutase
TDS	Produtos sólidos totais
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UFPR	Universidade Federal do Paraná
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
WHO	Organização Mundial da Saúde

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
=	Igual
<	Menor
>	Maior
®	Marca registrada
*	Asterisco
♀	Fêmea
♂	Macho
°C	Graus Celsius
As	Arsênio
CaSO ₄	Sulfato de cálcio
cm	Centímetros
F1	Primeira geração
g	Gramas
IC50	50% de inibição
h	Horas
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
KCl	Cloreto de potássio
KOH	Hipoclorito de sódio
L	Litro

L.min ⁻¹	Litro por minuto
m	Metro
M	Molar
MΩ	Megaohm
mA	Miliamper
min	Minuto
mg	Miligrama
mg.L ⁻¹	Miligrama por litro
mHz	Milihertz
ml	Mililitro
mM	Milimol
mol.L ⁻¹	Mol por litro
mV	Minivolt
nº	Número
n	Número de indivíduos
NaCl	Cloreto de sódio
NaBH ₄	Borohidreto de sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetro
nmol	Nanomol
nmol/min/mg	Nanomol por minuto por miligrama
nmoles/mg	Nanomoles por miligrama
P.A.	Pró-análise

ppm	Partes por milhão ($\mu\text{g}.\text{L}^{-1}$)
ppmS	Salinidade
ptn/min	Proteína por minuto
Sb	Antimônio
Sb_2O_3	Trióxido de antimônio
U	Unidade
x	Veze
χ^2	Qui-quadrado
V	Volts
W	Watts
μg	Micrograma
$\mu\text{g}.\text{L}^{-1}$	Micrograma por litro
$\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$	Micrograma por mililitro
μl	Microlitros
μM	Micromol
$\mu\text{S}/\text{cm}$	Condutividade

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	23
OBJETIVOS	30
Objetivo Geral	30
Objetivos Específicos	30
REFERÊNCIAS	31
CAPÍTULO I	38
RESUMO	39
1 INTRODUÇÃO	40
2 MATERIAL E MÉTODOS	44
2.1. Fluxograma de trabalho	44
2.2 Material Biológico	45
2.2.1 População de campo	45
2.2.2 Colônia Rockefeller	46
2.3 Ensaio de toxicidade	46
2.3.1 Condições gerais dos ensaios	46
2.3.2 Ensaio de Toxicidade Aguda	47
2.3.3 Ensaio de Toxicidade Subcrônica e Crônica	48
2.4 Biomarcador de genotoxicidade	49
2.5 Bioindicadores bioquímicos	51
2.5.1 Acetilcolinesterase (AChE)	51
2.5.2 Esterases α e β (α -EST e β -EST)	51
2.5.3 Glutathione S-Transferase (GST)	52
2.5.4 Catalase (CAT)	52
2.5.5 Peroxidação Lipídica (LPO)	52
2.5.6 Superóxido-Dismutase (SOD)	53
2.5.7 Proteína Total (PTN)	53
2.6 Parâmetros biológicos	53

2.7 Análise Estatística	55
3 RESULTADOS	56
3.1 Mortalidade.....	56
3.2 Biomarcador de genotoxicidade	56
3.3 Biomarcadores bioquímicos	57
3.4 Parâmetros biológicos	64
4 DISCUSSÃO	68
5 CONCLUSÃO.....	76
REFERÊNCIAS.....	77
CAPÍTULO II	85
RESUMO.....	86
1 INTRODUÇÃO	87
2 MATERIAL E MÉTODOS	89
2.1 Fluxograma de trabalho.....	89
2.2 Material Biológico	90
2.2.1 População de campo.....	90
2.2.2 Colônia Rockefeller	90
2.3 Ensaio de toxicidade	91
2.3.1 Condições gerais dos ensaios.....	91
2.3.2 Ensaio de Toxicidade Aguda	91
2.3.3. Ensaio de Toxicidade Subcrônica e Crônica	92
2.3.4 Quantificação do antimônio	94
2.4 Biomarcador de genotoxicidade	94
2.5 Biomarcadores bioquímicos	95
2.5.1 Acetilcolinesterase (AChE).....	96
2.5.2 Esterases α e β (α -EST e β -EST).....	96
2.5.3 Glutathione S-Transferase (GST).....	97
2.5.4 Catalase (CAT).....	97
2.5.5 Peroxidação Lipídica (LPO).....	97
2.5.6 Superóxido-Dismutase (SOD)	98
2.5.7 Proteína Total (PTN)	98

2.6 Parâmetros biológicos	98
2.7 Análise dos Dados	99
3. RESULTADOS	99
3.1 Quantificação do antimônio	99
3.2 Mortalidade.....	100
3.3 Biomarcador de genotoxicidade	101
3.4 Biomarcadores bioquímicos	102
3.5 Parâmetros biológicos	108
4. DISCUSSÃO	111
5. CONCLUSÃO.....	117
REFERÊNCIAS.....	118
CONSIDERAÇÕES FINAIS	124
REFERÊNCIAS GERAIS	125

INTRODUÇÃO

O avanço da atividade industrial e agrícola, associado ao distanciamento de práticas de exploração equilibrada dos recursos naturais e à intensidade de consumo da sociedade, têm gerado resíduos químicos excedentes, que atingem o solo, o ar, os alimentos e principalmente a água, ocasionando a contaminação ambiental (ARIAS et al., 2007; COSTA et al., 2008; ABDEL DAEM et al., 2012; BHINDER et al., 2012). Além disso, o aumento da contaminação pode ser atribuído à produção de novos compostos e do desenvolvimento e aplicação de técnicas mais precisas para a detecção dos contaminantes no ambiente (PARK; CHOI, 2007; GEISSEN et al., 2015).

O descarte indiscriminado de compostos orgânicos e inorgânicos no ambiente pode ser perigoso para os organismos, incluindo os seres humanos. Como consequência, a contaminação ambiental provoca alterações na composição química e física do ambiente, provocando redução na biodiversidade, alterações na estrutura e dinâmica das populações e representa risco à saúde humana (ARIAS et al., 2007; SANSEVERINO; NESSIMIAN, 2008).

No ambiente aquático, as fontes de poluição podem ser pontuais, como estações de tratamento de efluentes industriais, redes de esgoto doméstico, derramamentos acidentais e mineração, e são mais facilmente detectadas e controladas; e fontes não-pontuais, como por exemplo, a utilização de pesticidas no solo, de difícil controle por envolverem deposição parcial dos contaminantes na rota antes de atingirem os corpos d'água (COSTA et al., 2008).

A sensibilidade de um organismo diante da qualidade do seu ambiente é uma característica utilizada no biomonitoramento, pois os animais aquáticos ficam expostos a alterações no ambiente durante o ciclo de vida parcial ou completo (BHINDER et al., 2012). Esta avaliação biológica depende do fator a ser monitorado, do nível nutricional, idade do organismo, sexo, fase de desenvolvimento, características genéticas, além das propriedades ambientais como luminosidade e temperatura. Antes que os efeitos possam se expressar ao nível de populações, comunidades e ecossistemas, a resposta de organismos individuais fornece uma boa avaliação da qualidade ambiental (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008; BHINDER et al., 2012).

Para a escolha do bioindicador geralmente usam-se critérios como abundância e disponibilidade, cosmopolitismo da espécie, conhecimento da sua biologia, fisiologia, hábitos alimentares, uniformidade genética e morfológica de suas populações, facilidade de criação em laboratório e relevância econômica (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008; ZHOU et al., 2008).

Diante disto, a espécie *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) representa um modelo biológico eficiente para delinear as interações entre respostas genotípicas e fenotípicas em insetos aquáticos, e assim melhorar a compreensão dos impactos de poluentes em exemplares desta espécie e determinar a qualidade do ambiente (PRUD'HOMME et al., 2017, 2018).

A. aegypti é conhecido pela sua eficiente capacidade vetorial com uma elevada afinidade para o sangue humano. Ambos os sexos alimentam-se de seiva vegetal, porém as fêmeas necessitam das proteínas presentes no sangue de hospedeiros vertebrados, preferencialmente humanos, para que ocorra a maturação dos ovos (SIMOY et al., 2015; VAREJÃO et al., 2005). A espécie é responsável pela transmissão do agente etiológico de importantes doenças que atingem os seres humanos, como dengue, febre amarela urbana, zika e chikungunya que podem causar severa morbidade e mortalidade (POWELL; TABACHNICK, 2013).

O mosquito *A. aegypti* possui ciclo de vida curto, com quatro estágios distintos: ovo, larva, pupa e adulto, sendo os três primeiros estágios denominados imaturos e ocorrem em ambiente aquático (SIMOY et al., 2015). Seus ovos são colocados individualmente e podem ficar armazenados por meses até que seja induzida a eclosão (POWELL; TABACHNICK, 2013). O estágio larval é composto por quatro instares larvais, e juntos duram de sete a 14 dias, dependendo da temperatura, da densidade das larvas e da disponibilidade de alimentos (HIEN, 1975; SIMOY et al., 2015). A temperatura média ideal para a sobrevivência de *A. aegypti* tanto em campo quanto em laboratório é 25,5 °C (BRADY et al., 2013).

Apresentam função ecológica, agindo como filtradores de matéria orgânica e como fonte de alimento para níveis tróficos superiores (ROBERTS, 2014). Utilizam como local de oviposição reservatórios de água limpa, no entanto, adaptaram-se a locais ricos em matéria orgânica. Estes podem ser naturais, como campos agrícolas, lagoas e lagos artificiais, altamente urbanizados, como caixas d'água, pneus, recipientes plásticos, etc. (KITVATANACHAI et al., 2005; BHINDER; CHAUDHRY, 2013; TETREAU et al., 2013; LOVLEEN, 2015). As ações destinadas ao seu controle e os novos habitats disponíveis mostram a grande capacidade de adaptação que esta espécie apresenta (DOM et al., 2017).

Bartlett-Healy et al. (2012) e Kim et al. (2018) observaram mosquitos *Aedes* ocorrendo frequentemente em áreas rurais com recursos hídricos, como áreas úmidas e córregos. Dom et al. (2017), Kitvatanachai et al. (2011) e Mireji et al. (2008) verificaram que diferentes espécies de mosquitos, inclusive *A. aegypti*, adaptaram-se a locais de reprodução permanentes e temporários com presença de metais pesados. Este fator pode ter implicações epidemiológicas ao favorecer as espécies vetoras pela mudança

de habitat, ampliando o risco de aumento das taxas de agentes etiológicos (GUBLER; CLARK, 1995).

Na literatura, é comum encontrar estudos com *A. aegypti* relacionados a inseticidas e controle de vetor. No entanto, esta espécie também foi utilizada como modelo experimental em estudos de exposições a contaminantes e poluentes, utilizando diferentes biomarcadores. Prud'homme et al. (2018) observaram alterações fenotípicas na progênie de larvas em exposição crônica ao ibuprofeno, além de desenvolvimento acelerado, alterações transcricionais e aumento da tolerância à inanição; Prud'homme et al. (2017) analisaram o impacto de ibuprofeno, bisfenol-A e benzo[a]pireno na história de vida, relacionados a aumento na taxa de crescimento populacional e surgimento de tolerância ao Bti (*Bacillus thuringiensis*); Perez e Noriega (2012) verificaram o aumento na transcrição do gene da metalotioneína e a tolerância ao cobre em larvas com diferentes tempos de quiescência dos ovos, concluindo que as larvas que sobreviveram a longa quiescência são mais vulneráveis ao estresse ambiental; Perez e Noriega (2014) relataram aumento na expressão da metalotioneína, diminuição no armazenamento de lipídios e na massa corporal dos adultos provocados pelo estresse ao cobre, causando comprometimento no desenvolvimento e no desempenho de larvas e adultos; Poupardin et al. (2008) reportaram indução de múltiplos genes relacionados à detoxificação enzimática após exposição a herbicida atrazina, metal pesado cobre e hidrocarboneto fluoranteno; Song et al. (1997) observaram a neurotoxicidade e a mortalidade em exposição a aldicarbe, dimetoato, imidacloprida e tebufenozida; e Rayms-Keller et al. (1998) analisaram a taxa de mortalidade e falha na produção da matriz peritrófica dependentes da concentração provocadas pela exposição aguda a cádmio, mercúrio e cobre.

Outras espécies de culicídeos também foram utilizadas em estudos de biomonitoramento. Em *A. albopictus* foram verificados: dano genotóxico provocado pelo antibiótico ivermectina (MOLINARI et al., 2010); alterações na viabilidade, na proliferação e na morfologia de células expostas a mercúrio e cádmio (BRAECKMAN et al., 1997; BRAECKMAN; RAES; HOYE, 1997); em *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 foram observados: redução na taxas de emergência, na eclosão e na produção de ovos após exposição a chumbo, e maior emergência de fêmeas na segunda geração (KITVATANACHAI et al., 2005); redução na eclosão dos ovos e sobrevivência e indução na expressão gênica da metalotioneína em exposição, a fim de auxiliar na sobrevivência em água contaminada por cobre, zinco e cádmio (SARKAR; DUTTAGUPTA; MAL, 2004); em *Culex pipiens* Linnaeus, 1758 foram verificados, após exposição a cádmio, cobre, chumbo e mercúrio: aumento da mortalidade, redução na fecundidade das fêmeas, na eclosão de ovos, na quantidade de carboidrato no corpo dos adultos e de

lipídio no corpo das fêmeas (EL-SHEIKH et al., 2010); anormalidade no corpo gorduroso e efeitos histopatológicos nos órgãos sexuais, representados pela redução e degeneração dos oócitos nas fêmeas e redução das espermatogônias e espermátocitos em machos (HASSAN; HASABALLAH, 2011); em *Anopheles gambiae* Giles, 1926, após exposição a cádmio, cobre e chumbo foram relatados: aumento nas expressões gênicas da metalotioneína e da α -tubulina e a capacidade de desenvolver tolerância aos metais entre as gerações (MIREJI et al., 2006, 2010), aumento da tolerância aos metais três gerações após a exposição aos imaturos, com redução da viabilidade dos ovos, sobrevivência de larvas e pupas, emergência dos adultos, fecundidade e taxa de reprodução (MIREJI et al., 2011); redução na expressão gênica da enzima citocromo p450 em exposição a cádmio e chumbo (MUSASIA et al., 2013) e respostas transcricionais associadas ao metabolismo, transporte e síntese de proteínas reguladas pela exposição ao cádmio (MUTURI et al., 2017).

Dentre os poluentes que causam contaminação ambiental, estão os grupos dos ftalatos e compostos de antimônio (MIHUCZ; ZÁRAY, 2016). Os ftalatos são substâncias químicas plastificantes utilizadas principalmente na produção do PVC (cloreto de polivinil). São facilmente liberados no ambiente através do descarte inadequado dos resíduos plásticos e contaminam os alimentos, o ar e a água. São desreguladores endócrinos, interferindo no funcionamento natural do sistema hormonal de espécies animais, incluindo os seres humanos. Os ftalatos mais utilizados na produção industrial são: DEHP (di-(2-etilhexil) ftalato), DBP (dibutil ftalato) e o BBP (butil benzil ftalato) (HALDEN, 2010; BONO-BLAY et al., 2012; LENOIR et al., 2014). O BBP entrou em 2014 na lista de compostos que apresentam riscos ambientais da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 2014).

O antimônio (Sb) ocorre naturalmente no ambiente e seus compostos são utilizados na produção de tecidos, plásticos e resinas, principalmente como retardante da propagação de chamas. Sua principal forma de entrada no ambiente são pelos despejos industriais e pela queima dos produtos que contém antimônio em sua composição (ANDERSON, 2012; FERREIRA et al., 2014). São de fácil passagem pelas membranas celulares, e também apresentam função de desreguladores endócrinos em vertebrados e invertebrados (GHISELLI; JARDIM, 2007).

Os desreguladores endócrinos podem funcionar como mimetizadores, no qual o agente exógeno se liga ao receptor celular provocando uma superprodução da resposta, ou como bloqueador dos hormônios endógenos, gerando a ausência ou diminuição da resposta natural (BIRKETT; LESTER, 2003). Podem interferir na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios responsáveis pela manutenção,

reprodução, desenvolvimento e comportamento dos organismos (MIHUCZ; ZÁRAY, 2016).

Tanto o BBP quanto o Sb são nocivos aos organismos aquáticos, inclusive aos invertebrados. Apresentam toxicidade em exposições aguda e crônica, e provocam efeitos sobre o crescimento devido a semelhança estrutural entre os xenobióticos e os hormônios envolvidos (CUVILLIER-HOT et al., 2014; MIHUCZ; ZÁRAY, 2016).

Os ensaios de toxicidade representam uma importante ferramenta da ecotoxicologia, pois visam determinar os efeitos tóxicos ocasionados pela exposição de organismos a contaminantes ambientais (COSTA et al., 2008). A exposição a um agente tóxico pode ser aguda, de 24 a 48 horas de duração e servem para avaliar os efeitos letais dos contaminantes ambientais sobre os organismos expostos; subcrônica, referente a uma exposição constante, em um tempo de exposição de aproximadamente 10% do tempo total de vida, ou crônica, para avaliar a ação dos poluentes a um estímulo de longa duração, geralmente por um período de mais de um terço do ciclo de vida até a totalidade da vida do organismo. De modo geral, estes efeitos são subletais e observados em situações em que as concentrações do agente tóxico permitem a sobrevivência do organismo, mas afetam suas funções biológicas, interferindo na reprodução, comportamento, desenvolvimento e crescimento (COSTA et al., 2008; MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008).

A avaliação do impacto causado pelos poluentes deve contar com metodologias adequadas que reflitam o estado da contaminação ambiental (BHINDER et al., 2012). Para que haja uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos e dos efeitos adversos, têm sido recomendada a abordagem de múltiplos biomarcadores simultaneamente, agrupando respostas nos diferentes níveis de organização biológica, cada um influenciando a estrutura e as funções dos níveis subsequentes (GALLOWAY, 2006; GARMENDIA et al., 2011).

A genotoxicidade é considerada um importante biomarcador em testes de toxicidade química e avaliação de riscos. Dentre os testes de genotoxicidade, o ensaio cometa é uma técnica rápida e sensível, capaz de detectar danos no DNA passíveis de reparo. Possui como vantagem a necessidade de análise de um pequeno número de células e pode ser executado com qualquer organismo eucarioto (PARK; CHOI, 2007; DUA et al., 2013).

Este ensaio é utilizado em humanos e outros animais, porém o número de trabalhos em insetos é reduzido. Dentro da ordem Diptera, existem trabalhos utilizando o ensaio cometa para verificar a toxicidade a diversos compostos em *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830) (MEHDI; QAMAR, 2013; MISHRA et al., 2014; ALARABY et al., 2015; CARMONA et al., 2015; DEMIR et al., 2015) e em espécies do gênero

Chironomus Meigen, 1803 (LEE; CHOI, 2006; PARK; CHOI, 2007, 2009; AL-SHAMI et al., 2011; NAIR et al., 2011; MARTÍNEZ-PAZ et al., 2013; MORAIS et al., 2014, 2019; VICENTINI et al., 2017). Em Culicidae, foi verificada a atividade genotóxica do óleo essencial da semente de *Psoralea corylifolia* Linn (Fabaceae) em *C. quinquefasciatus* (DUA et al., 2013).

Os efeitos tóxicos também podem ser analisados por meio das alterações nas vias bioquímicas. Ao entrar em contato com os xenobióticos, podem ser desencadeadas reações de detoxificação no organismo, catalisadas por um sistema multienzimático, em que ocorrem alterações bioquímicas do xenobiótico em substâncias mais estáveis e facilmente excretáveis (BRAGA; VALLE, 2007). Alterações na transmissão do impulso nervoso são reguladas pela acetilcolinesterase (AChE); Alterações na via antioxidante podem envolver as enzimas esterase alfa (EST- α), esterase beta (EST- β) e glutathione-S-transferase (GST), que atuam na biotransformação, e superóxido-dismutase (SOD) e catalase (CAT) que atuam na neutralização de espécies reativas de oxigênio (EROS). Como marcador de dano oxidativo verifica-se a peroxidação lipídica (LPO), que altera a composição e estrutura da membrana celular (VALLE; MONTELLA, 2006; CALADO et al., 2017).

A morfometria fornece respostas quanto à variação fenotípica dos indivíduos em relação ao estresse ambiental e exposição a xenobióticos, podendo ser utilizada como um biomarcador de alterações de caracteres morfológicos (ARAMBOUROU et al., 2012; DHIVYA; MANIMEGALAI, 2013). Apesar disso, são escassos os trabalhos relacionando compostos tóxicos à variação morfométrica das asas em dípteros, sendo encontrados trabalhos com a família Chironomidae (HOFFMANN et al., 2005; PARK et al., 2009; ARAMBOUROU et al., 2012, 2014). Para a família Culicidae, Mpho et al. (2000) utilizaram a técnica para verificar a assimetria flutuante em resposta ao estresse ambiental em *C. quinquefasciatus*; e Jirakanjanakit et al. (2007) e Stephens e Juliano (2012) em *A. aegypti*, porém os fatores foram relacionados somente à alimentação, temperatura e densidade e não à exposição a xenobióticos.

Os estudos ecotoxicológicos não permitem a obtenção da real complexidade da vida na natureza, havendo distinção entre os resultados obtidos em condições laboratoriais e de campo (HOLMSTRUP et al., 2010). Em populações mantidas em laboratório por diversos anos ocorre isolamento reprodutivo e aumento da homozigotidade, podendo gerar redução do valor adaptativo e afetar o desenvolvimento do inseto (POWELL; EVANS, 2017; ROSS; ENDERSBY-HARSHMAN; HOFFMANN, 2017), enquanto as populações naturais são geneticamente heterogêneas (JIRAKANJANAKIT; DUJARDIN, 2005; JIRAKANJANAKIT et al., 2008). Além disso, populações provenientes do campo possivelmente entraram em contato previamente

com compostos tóxicos de naturezas diversas, tendo seus sistemas metabólicos adaptados às condições físico-químicas do nicho ecológico em que habitam (HERRERO et al., 2014).

A fim de mitigar esta fragilidade, procuramos analisar os efeitos da exposição aos xenobióticos em populações provenientes de laboratório e campo. A primeira é composta por organismos criados em laboratório por diversas gerações, em que ocorre isolamento reprodutivo e aumento da homozigosidade. A população de campo é composta por organismos procedentes de cenários naturais, em que os indivíduos parentais possivelmente foram expostos a diversos fatores de estresse em seu habitat, não sendo possível apontar a substância responsável por determinado efeito tóxico.

Avaliar os danos ao DNA, determinar a atividade de enzimas, e avaliar a mortalidade e a influência no desenvolvimento são parâmetros comparativos e complementares que podem fornecer informações sobre como antimônio e butil benzil ftalato agem no organismo de *A. aegypti*, avaliando o impacto destas substâncias e seus efeitos sobre a biologia da espécie, que, além de relevante como vetor de agentes etiológicos, pode ser um modelo para estudos de toxicidade.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar os efeitos das exposições aguda, subcrônica e crônica de antimônio e butil benzil ftalato em larvas de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) em diferentes níveis organizacionais.

Objetivos Específicos

- Avaliar a mortalidade provocada pelas exposições aguda, subcrônica e crônica de antimônio e butil benzil ftalato em larvas de *A. aegypti*;
- Estimar os danos ao DNA em larvas de *A. aegypti* após exposições aguda, subcrônica e crônica a antimônio e butil benzil ftalato;
- Determinar a atividade das enzimas Acetilcolinestase, Glutathione S-transferase, Esterases Alfa e Beta, Superóxido Dismutase, Catalase e danos de peroxidação lipídica em larvas de *A. aegypti* expostas a antimônio e butil benzil ftalato em exposições aguda e subcrônica;
- Verificar a variabilidade morfológica das asas de *A. aegypti* em exposição crônica ao antimônio;
- Avaliar a influência de antimônio e butil benzil ftalato durante o desenvolvimento, emergência de adultos e razão sexual de *A. aegypti* em exposição crônica a antimônio e butil benzil ftalato.

REFERÊNCIAS

- ABDEL DAIEM, M. M.; RIVERA-UTRILLA, J.; OCAMPO-PÉREZ, R.; MÉNDEZ-DÍAZ, J. D.; SÁNCHEZ-POLO, M. Environmental impact of phthalic acid esters and their removal from water and sediments by different technologies - A review. **Journal of Environmental Management**, v. 109, n. 1, p. 164–178, 2012. DOI. 10.1016/j.jenvman.2012.05.014.
- AL-SHAMI, S. A.; RAWI, C. S. M.; AHMAD, A. H.; NOR, S. A. M. Genotoxicity of heavy metals to the larvae of *Chironomus kiiensis* Tokunaga after short-term exposure. **Toxicology and Industrial Health**, v. 28, n. 8, p. 734–739, out. 2011. DOI. 10.1177/0748233711422729.
- ALARABY, M.; ANNANGI, B.; HERNÁNDEZ, A.; CREUS, A.; MARCOS, R. A comprehensive study of the harmful effects of ZnO nanoparticles using *Drosophila melanogaster* as an in vivo model. **Journal of hazardous materials**, v. 296, n. 1, p. 166–174, out. 2015. DOI. 10.1016/j.jhazmat.2015.04.053.
- ANDERSON, C. G. The metallurgy of antimony. **Chemie der Erde**, v. 72, n. 4, p. 3–8, jul. 2012. DOI. 10.1016/j.chemer.2012.04.001.
- ARAMBOUROU, H.; BEISEL, J.-N.; BRANCHU, P.; DEBAT, V. Patterns of fluctuating asymmetry and shape variation in *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) exposed to nonylphenol or lead. **PloS one**, v. 7, n. 11, p. e48844, jan. 2012. DOI. 10.1371/journal.pone.0048844.
- ARAMBOUROU, H.; BEISEL, J.-N.; BRANCHU, P.; DEBAT, V. Exposure to sediments from polluted rivers has limited phenotypic effects on larvae and adults of *Chironomus riparius*. **The Science of the Total Environment**, v. 484, n. 1, p. 92–101, jun. 2014. DOI. 10.1016/j.scitotenv.2014.03.010.
- ARIAS, A. R. L.; BUSS, D. F.; ALBURQUERQUE, C. de; INÁCIO, A. F.; FREIRE, M. M.; EGLER, M.; MUGNAI, R.; BAPTISTA, D. F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 61–72, 2007. DOI. 10.1590/S1413-81232007000100011.
- BARTLETT-HEALY, K.; UNLU, I.; OBENAUER, P.; HUGHES, T.; HEALY, S.; CREPEAU, T.; FARAJOLLAHI, A.; KESAVARAJU, B.; FONSECA, D.; SCHOELE, G.; GAUGLER, R.; STRICKMAN, D. A. Larval Mosquito Habitat Utilization and Community Dynamics of *Aedes albopictus* and *Aedes japonicus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 49, n. 4, p. 813–824, 2012. DOI. 10.1603/me11031.
- BHINDER, P.; CHAUDHRY, A. Evaluation of toxic potential of acephate and chlorpyrifos by dominant lethal test on *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Environmental Biology**, v. 34, n. 1, p. 573–577, 2013.
- BHINDER, P.; CHAUDHRY, A.; KUMAR, R.; KAUR, R. Dominant lethal test based genotoxicity evaluation of propoxur and methyl parathion in *Culex quinquefasciatus*. **International Journal of Pharmaceutical Research and Bio-Science**, v. 1, n. 6, p. 112–122, 2012.
- BIRKETT, J. W.; LESTER, J. N. **Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes**. Lewis Pub, 2003.
- BONO-BLAY, F.; GUART, A.; FUENTE, B.; PEDEMONTE, M.; PASTOR, M. C.;

BORRELL, A.; LACORTE, S. Survey of phthalates, alkylphenols, bisphenol A and herbicides in Spanish source waters intended for bottling. **Environmental science and pollution research international**, v. 19, n. 8, p. 3339–3349, set. 2012. DOI. 10.1007/s11356-012-0851-y.

BRADY, O. J.; JOHANSSON, M. A.; GUERRA, C. A.; BHATT, S.; GOLDING, N.; PIGOTT, D. M.; DELATTE, H.; GRECH, M. G.; LEISNHAM, P. T.; MACIEL-DE-FREITAS, R.; STYER, L. M.; SMITH, D. L.; SCOTT, T. W.; GETHING, P. W.; HAY, S. I. Modelling adult *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* survival at different temperatures in laboratory and field settings. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 351, p. 1–12, 2013. DOI. 10.1186/1756-3305-6-351.

BRAECKMAN, B. P.; RAES, H.; HOYE, D. Van. Heavy-metal toxicity in an insect cell line. Effects of cadmium chloride, mercuric chloride and methylmercuric chloride on cell viability and proliferation in *Aedes albopictus* cells. **Cell Biology and Toxicology**, v. 13, p. 389–397, 1997.

BRAECKMAN, B. P.; SIMOENS, C.; RZEZNIK, U.; RAES, H. Effect of sublethal doses of Cadmium, Inorganic Mercury and Methylmercury on the cell morphology of an insect cell line (*Aedes albopictus*, C6/36). **Cell Biology International**, v. 21, n. 12, p. 823–832, 1997.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, p. 279–293, 2007. DOI. 10.5123/s1679-49742007000400006.

CALADO, S. L. M.; WOJCIECHOWSKI, J.; SANTOS, G. S.; MAGALHÃES, V. F.; PADIAL, A. A.; CESTARI, M. M.; SILVA DE ASSIS, H. C. Neurotoxins in a water supply reservoir: An alert to environmental and human health. **Toxicon**, v. 126, p. 12–22, 2017. DOI. 10.1016/j.toxicon.2016.12.002.

CARMONA, E. R.; INOSTROZA-BLANCHETEAU, C.; OBANDO, V.; RUBIO, L.; MARCOS, R. Genotoxicity of copper oxide nanoparticles in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v. 791, n. 1, p. 1–11, set. 2015. DOI. 10.1016/j.mrgentox.2015.07.006.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008. DOI. 10.1590/s0100-40422008000700038.

CUVILLIER-HOT, V.; SALIN, K.; DEVERS, S.; TASIEMSKI, A.; SCHAFFNER, P.; BOULAY, R.; BILLIARD, S.; LENOIR, A. Impact of ecological doses of the most widespread phthalate on a terrestrial species, the ant *Lasius niger*. **Environmental research**, v. 131, n. 1, p. 104–110, maio 2014. DOI. 10.1016/j.envres.2014.03.016.

DEMIR, E.; AKSAKAL, S.; TURNA, F.; KAYA, B.; MARCOS, R. *In vivo* genotoxic effects of four different nano-sizes forms of silica nanoparticles in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 283, n. 1, p. 260–266, jan. 2015. DOI. 10.1016/j.jhazmat.2014.09.029.

DHIVYA, R.; MANIMEGALAI, K. Wing Shape Analysis of the *Japanese encephalitis* vector *Culex gelidus* (Diptera: Culicidae) at the Foot Hill of Southern Western Ghats, India. **World Journal of Zoology**, v. 8, n. 1, p. 119–125, 2013. DOI. 10.5829/idosi.wjz.2013.8.1.7277.

DOM, N. C.; AHMAD, P.; AZMAN, M.; MOKHTAR, M. Assessment of heavy metal concentration on *Aedes* mosquito breeding sites in urban area, Malaysia. **International Journal of Mosquito Research**, v. 4, n. 2, p. 12–19, 2017.

- DUA, V. K.; KUMAR, A.; PANDEY, A. C.; KUMAR, S. Insecticidal and genotoxic activity of *Psoralea corylifolia* Linn. (Fabaceae) against *Culex quinquefasciatus* Say, 1823. **Parasites & vectors**, v. 6, n. 1, p. 30, jan. 2013. DOI. 10.1186/1756-3305-6-30.
- EL-SHEIKH, T. M. Y.; FOUDA, M. A.; HASSAN, M. I.; ABD-ELGHAPHAR, A.-E. A.; HASABALLAH, A. I. Toxicological Effects of Some Heavy Metal Ions on *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). **Egyptian Academic Journal of Biological Science**, v. 2, n. 1, p. 63–76, 2010. DOI. 10.21608/eajbsf.2010.17465.
- FERREIRA, S. L. C.; SANTOS, W. N. L.; SANTOS, I. F.; JUNIOR, M. M. S.; SILVA, L. O. B.; BARBOSA, U. A.; SANTANA, F. A.; QUEIROZ, A. F. S. Strategies of sample preparation for speciation analysis of inorganic antimony using hydride generation atomic spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 114, n. 1, p. 22–31, 2014. DOI. 10.1016/j.microc.2013.11.019.
- GALLOWAY, T. S. Biomarkers in environmental and human health risk assessment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 53, n. 1, p. 606–613, 2006. DOI. 10.1016/j.marpolbul.2006.08.013.
- GARMENDIA, L.; IZAGIRRE, U.; CAJARAVILLE, M. P.; MARIGÓMEZ, I. Application of a battery of biomarkers in mussel digestive gland to assess long-term effects of the Prestige oil spill in Galicia and the Bay of Biscay: Lysosomal responses. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, n. 4, p. 901–914, 2011. DOI. 10.1039/c0em00409j.
- GEISSEN, V.; MOL, H.; KLUMPP, E.; UMLAUF, G.; NADAL, M.; VAN DER PLOEG, M.; VAN DE ZEE, S. E. A. T. M.; RITSEMA, C. J. Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management. **International Soil and Water Conservation Research**, v. 3, n. 1, p. 57–65, 2015. DOI. 10.1016/j.iswcr.2015.03.002.
- GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 695–706, 2007.
- GUBLER, D. J.; CLARK, G. G. Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever: The emergence of a global health problem. **Emerging Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, p. 55–57, 1995.
- HALDEN, R. U. Plastics and Health Risks. **Annual Review of Public Health**, v. 31, n. 1, p. 179–194, 2010. DOI. 10.1055/s-2004-832376.
- HASSAN, M. I.; HASABALLAH, A. Histopathological effect of certain heavy metals on the mosquito vector *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). **Al-Azhar Bulletin of Science**, v. 22, n. 1, p. 69–83, 2011. DOI. 10.21608/absb.2011.7036.
- HERRERO, Ó.; PLANELLÓ, R.; AQUILINO, M.; MORCILLO, G. Evaluación de los efectos tóxicos de ftalatos sobre poblaciones naturales de *Chironomus riparius* (Diptera): implicaciones en estudios de ecotoxicidad. **Revista de Toxicología**, v. 31, n. 2, p. 176–186, 2014.
- HIEN, D. S. Biology of *Aedes aegypti* (L., 1762) and *Aedes albopictus* (Skuse, 1895) (Diptera, Culicidae). III. effect of certain environmental conditions on the development of larvae and pupae. **Acta Parasitologica Polonica**, v. 23, n. 46, p. 553–568, 1975.
- HOFFMANN, A. A.; WOODS, R. E.; COLLINS, E.; WALLIN, K.; WHITE, A.; MCKENZIE, J. A. Wing shape versus asymmetry as an indicator of changing environmental conditions in insects. **Australian Journal of Entomology**, v. 44, n. 3, p. 233–243, ago. 2005. DOI. 10.1111/j.1440-6055.2005.00469.x.
- HOLMSTRUP, M.; BINDESBØL, A. M.; OOSTINGH, G. J.; DUSCHL, A.; SCHEIL, V.; KÖHLER, H. R.; LOUREIRO, S.; SOARES, A. M. V. M.; FERREIRA, A. L. G.; KIENTLE, C.; GERHARDT, A.; LASKOWSKI, R.; KRAMARZ, P. E.; BAYLEY, M.; SVENDSEN, C.; SPURGEON, D. J. Interactions between effects of environmental chemicals and natural

stressors: A review. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 1, p. 3746–3762, 2010. DOI. 10.1016/j.scitotenv.2009.10.067.

JIRAKANJANAKIT, N.; DUJARDIN, J. P. Discrimination of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) laboratory lines based on wing geometry. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 36, n. 4, p. 858–861, 2005.

JIRAKANJANAKIT, N.; LEEMINGSAWAT, S.; DUJARDIN, J. P. The geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti* in isofemale lines through successive generations. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, n. 4, p. 414–421, jul. 2008. DOI. 10.1016/j.meegid.2007.05.004.

JIRAKANJANAKIT, N.; LEEMINGSAWAT, S.; THONGRUNGIAT, S.; APIWATHNASORN, C.; SINGHANIYOM, S.; BELLEC, C.; DUJARDIN, J. P. Influence of larval density or food variation on the geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti*. **Tropical Medicine and International Health**, v. 12, n. 11, p. 1354–1360, nov. 2007. DOI. 10.1111/j.1365-3156.2007.01919.x.

KIM, J. E.; BAE, Y. J.; LEE, H. G.; KIM, D. G. Analysis of habitat characteristics of mosquitoes in Danwon-gu, Ansan city, Korea, based on civil complaint data. **Entomological Research**, v. 48, n. 6, p. 540–549, 2018. DOI. 10.1111/1748-5967.12330.

KITVATANACHAI, S.; APIWATHNASORN, C.; LEEMINGSAWAT, S.; WONGWIT, W.; HJ, O. Lead levels of *Culex* mosquito larvae inhabiting lead utilizing factory. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 1, p. 64–68, 2011. DOI. 10.1016/S2221-1691(11)60070-1.

KITVATANACHAI, S.; APIWATHNASORN, C.; LEEMINGSAWAT, S.; WONGWIT, W.; TORNEE, S. Determination of lead toxicity in *Culex quinquefasciatus* mosquitoes in the laboratory. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 36, n. 4, p. 862–874, 2005.

LEE, S.-B.; CHOI, J. Multilevel evaluation of nonyphenol toxicity in fourth-instar larvae of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 11, p. 3006–3014, 2006. DOI. 10.1897/05-601r1.1.

LENOIR, A.; TOUCHARD, A.; DEVERS, S.; CHRISTIDÈS, J.-P.; BOULAY, R.; CUVILLIER-HOT, V. Ant cuticular response to phthalate pollution. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 1, p. 13446–13451, dez. 2014. DOI. 10.1007/s11356-014-3272-2.

LOVLEEN, M. Mutagenicity analysis of ethion using *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 7, p. 533–539, 2015.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO-FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 355–381, 2008. DOI. 10.4257/oeco.2008.1203.02.

MARTÍNEZ-PAZ, P.; MORALES, M.; MARTÍNEZ-GUITARTE, J. L.; MORCILLO, G. Genotoxic effects of environmental endocrine disruptors on the aquatic insect *Chironomus riparius* evaluated using the comet assay. **Mutation Research**, v. 758, n. 1–2, p. 41–47, dez. 2013. DOI. 10.1016/j.mrgentox.2013.09.005.

MEHDI, S. H.; QAMAR, A. Paraquat-induced ultrastructural changes and DNA damage in the nervous system is mediated via oxidative-stress-induced cytotoxicity in *Drosophila melanogaster*. **Toxicological Sciences**, v. 134, n. 2, p. 355–365, ago. 2013. DOI. 10.1093/toxsci/kft116.

- MIHUCZ, V. G.; ZÁRAY, G. Occurrence of antimony and phthalate esters in polyethylene terephthalate bottled drinking water. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 51, n. 3, p. 183–209, 2016. DOI. 10.1080/05704928.2015.1105243.
- MIREJI, P. O.; KEATING, J.; HASSANALI, A.; IMPOINVIL, D. E.; MBOGO, C. M.; MUTURI, M. N.; NYAMBAKA, H.; GITHURE, J. I.; BEIER, J. C.; KENYA, E. U.; GITHURE, J. I.; BEIER, J. C. Expression of metallothionein and alpha-tubulin in heavy metal-tolerant *Anopheles gambiae* sensu stricto (Diptera: Culicidae). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 73, n. 1, p. 46–50, jan. 2010. DOI. 10.1016/j.ecoenv.2009.08.004.
- MIREJI, P. O.; KEATING, J.; HASSANALI, A.; MBOGO, C. M.; MUTURI, M. N.; GITHURE, J. I.; BEIER, J. C. Biological cost of tolerance to heavy metals in the mosquito *Anopheles gambiae*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 24, n. 2, p. 101–107, 2011. DOI. 10.1111/j.1365-2915.2010.00863.x.Biological.
- MIREJI, P. O.; KEATING, J.; HASSANALI, A.; MBOGO, C. M.; NYAMBAKA, H.; KAHINDI, S.; JOHN C. Heavy metals in mosquito larval habitats in urban Kisumu and Malindi, Kenya, and their impact. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 70, n. 1, p. 147–153, 2008. DOI. 10.1016/j.ecoenv.2007.03.012.Heavy.
- MIREJI, P. O.; KEATING, J.; MBOGO, C.; NYAMBAKA, H.; OSIR, E.; GITHURE, J.; BEIER, J. Differential induction of proteins in *Anopheles gambiae* sensu stricto (Diptera: Culicidae) larvae in response to heavy metal selection. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 26, n. 4, p. 214–226, 2006. DOI. 10.1017/S1742758406658955.
- MISHRA, M.; SHARMA, A.; SHUKLA, A. K.; KUMAR, R.; DWIVEDI, U. N.; KAR CHOWDHURI, D. Genotoxicity of dichlorvos in strains of *Drosophila melanogaster* defective in DNA repair. **Mutation Research**, v. 766, n. 1, p. 35–41, maio 2014. DOI. 10.1016/j.mrgentox.2014.02.004.
- MOLINARI, G.; SOLONESKI, S.; REIGOSA, M. A.; LARRAMENDY, M. L. Genotoxic and cytotoxic in vitro evaluation of ivermectin and its formulation ivomec® on *Aedes albopictus* larvae (CCL-126™) cells. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 92, n. 8, p. 1577–1593, 2010. DOI. 10.1080/02772241003625284.
- MORAIS, G. dos S.; PESENTI, E. C.; CESTARI, M. M.; NAVARRO-SILVA, M. A. Genotoxic effect of Phenanthrene on *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae). **Zoologia**, v. 31, n. 4, p. 323–328, 2014. DOI. 10.1590/s1984-46702014000400003.
- MORAIS, G. dos S.; VIEIRA, T. B.; GUSTAVO SOUZA SANTOS; BAIKA, L. M.; CESTARI, M. M.; GRASSI, M. T.; NAVARRO-SILVA, M. A. Biological, biochemical and genotoxic effects of Sb in the midge *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981 (Diptera: Chironomidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2019.
- MPHO, M.; HOLLOWAY, G. J.; CALLAGHAN, A. Fluctuating wing asymmetry and larval density stress in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 90, n. 1, p. 279–283, 2000. DOI. 10.1017/s0007485300000390.
- MUSASIA, F. K.; ISAAC, A. O.; MASIGA, D. K.; OMEDO, I. A.; MWAKUBAMBANYA, R.; OCHIENG, R.; MIREJI, P. O. Sex-specific induction of CYP6 cytochrome P450 genes in cadmium and lead tolerant *Anopheles gambiae*. **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, p. 97–101, 2013. DOI. 10.1186/1475-2875-12-97.
- MUTURI, C. N.; RONO, M. K.; MASIGA, D. K.; WACHIRA, F. N.; OCHIENG, R.; MIREJI, P. O. Transcriptional responses of *Anopheles gambiae* s. s mosquito larvae to chronic exposure of cadmium heavy metal. **F1000 Research**, v. 6, n. 0, p. 2173, 2017. DOI. 10.12688/f1000research.13062.1.

- NAIR, P. M. G.; PARK, S. Y.; LEE, S.-W. W.; CHOI, J. Differential expression of ribosomal protein gene, gonadotrophin releasing hormone gene and Balbiani ring protein gene in silver nanoparticles exposed *Chironomus riparius*. **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 1, p. 31–37, jan. 2011. DOI. 10.1016/j.aquatox.2010.08.013.
- PARK, K.; BANG, H. W.; PARK, J.; KWAK, I.-S. Ecotoxicological multilevel-evaluation of the effects of fenbendazole exposure to *Chironomus riparius* larvae. **Chemosphere**, v. 77, n. 3, p. 359–67, out. 2009. DOI. 10.1016/j.chemosphere.2009.07.019.
- PARK, S. Y.; CHOI, J. Cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity assay using human cell and environmental species for the screening of the risk from pollutant exposure. **Environment International**, v. 33, n. 6, p. 817–822, ago. 2007. DOI. 10.1016/j.envint.2007.03.014.
- PARK, S. Y.; CHOI, J. Genotoxic effects of nonylphenol and bisphenol A exposure in aquatic biomonitoring species: freshwater *Daphnia magna*, and aquatic midge, *Chironomus riparius*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 83, n. 4, p. 463–468, out. 2009. DOI. 10.1007/s00128-009-9745-1.
- PEREZ, M. H.; NORIEGA, F. G. *Aedes aegypti* pharate 1st instar quiescence affects larval fitness and metal tolerance. **Journal of Insect Physiology**, v. 58, n. 1, p. 824–829, jun. 2012. DOI. 10.1016/j.jinsphys.2012.03.005.
- PEREZ, M. H.; NORIEGA, F. G. Sub-lethal metal stress response of larvae of *Aedes aegypti*. **Physiological Entomology**, v. 39, n. 2, p. 111–119, jun. 2014. DOI. 10.1111/phen.12054.
- POUPARDIN, R.; REYNAUD, S.; STRODE, C.; RANSON, H.; VONTAS, J. G.; DAVID, J.-P. Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: impact on larval tolerance to chemical insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 5, p. 540–551, maio 2008. DOI. 10.1016/j.ibmb.2008.01.004.
- POWELL, J. R.; EVANS, B. R. How Much Does Inbreeding Reduce Heterozygosity? Empirical Results from *Aedes aegypti*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 1, p. 157–158, 2017. DOI. 10.4269/ajtmh.16-0693.
- POWELL, J. R.; TABACHNICK, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 1, p. 11–17, jan. 2013. DOI. 10.1590/0074-0276130395.
- PRUD'HOMME, S. M.; CHAUMOT, A.; CASSAR, E.; DAVID, J.-P.; REYNAUD, S. Impact of micropollutants on the life-history traits of the mosquito *Aedes aegypti*: On the relevance of transgenerational studies. **Environmental Pollution**, v. 220, n. 1, p. 242–254, 2017. DOI. 10.1016/j.envpol.2016.09.056.
- PRUD'HOMME, S. M.; RENAULT, D.; DAVID, J. P.; REYNAUD, S. Multiscale Approach to Deciphering the Molecular Mechanisms Involved in the Direct and Intergenerational Effect of Ibuprofen on Mosquito *Aedes aegypti*. **Environmental Science and Technology**, v. 52, n. 14, p. 7937–7950, 2018. DOI. 10.1021/acs.est.8b00988.
- RAYMS-KELLER, A.; OLSON, K. E.; MCGAW, M.; ORAY, C.; CARLSON, J. O.; BEATY, B. J. Effect of Heavy Metals on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Larvae. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 47, n. 39, p. 41–47, 1998.
- ROBERTS, D. Mosquito Larvae Change Their Feeding Behavior in Response to Kairomones From Some Predators. **Journal of Medical Entomology**, v. 51, n. 2, p. 368–374, 2014. DOI. 10.1603/ME13129.
- ROSS, P. A.; ENDERSBY-HARSHMAN, N. M.; HOFFMANN, A. A. A comprehensive

assessment of inbreeding and laboratory adaptation in *Aedes aegypti* mosquitoes. **Evolutionary Applications**, v. bioRxiv 23, 2017. DOI. 10.1111/eva.12740.

SANSEVERINO, A. M.; NESSIMIAN, J. L. Assimetria flutuante em organismos aquáticos e sua aplicação para avaliação de impactos ambientais. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 382–405, 2008. DOI. 10.4257/oeco.2008.1203.03.

SARKAR, S.; DUTTAGUPTA, A. K.; MAL, T. K. Effects of heavy metals on population growth and metallothionein gene expression in the mosquito *Culex quinquefasciatus*, from Calcutta, India. **Environmental Pollution**, v. 127, n. 2, p. 183–193, jan. 2004. DOI. 10.1016/j.envpol.2003.08.005.

SIMOY, M. I.; SIMOY, M. V.; CANZIANI, G. A. The effect of temperature on the population dynamics of *Aedes aegypti*. **Ecological Modelling**, v. 314, n. 1, p. 100–110, 2015. DOI. 10.1016/j.ecolmodel.2015.07.007.

SONG, M. Y.; STARK, J. D.; BROWN, J. J. Comparative toxicity of four insecticides, including imidacloprid and tebufenozide, to four aquatic arthropods. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 12, p. 2494–2500, 1997. DOI. <https://doi.org/10.1002/etc.5620161209>.

STEPHENS, C. R.; JULIANO, S. A. Wing Shape as an Indicator of Larval Rearing Conditions for *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 49, n. 4, p. 927–938, 2012. DOI. 10.1603/me12012.

TETREAU, G.; CHANDOR-PROUST, A.; FAUCON, F.; STALINSKI, R.; AKHOUAYRI, I.; PRUD'HOMME, S. M.; RAVETON, M.; REYNAUD, S. Contrasting patterns of tolerance between chemical and biological insecticides in mosquitoes exposed to UV-A. **Aquatic Toxicology**, v. 140–141, p. 389–397, 2013. DOI. 10.1016/j.aquatox.2013.07.004.

U.S.EPA. **IRIS Toxicological Review of Butyl Benzyl Phthalate (BBP) (Preliminary Assessment Materials)** Washington, DC U.S. Environmental Protection Agency, 2014.

VALLE, D.; MONTELLA, I. R. Quantification methodology for enzyme activity related to insecticide resistance in *Aedes aegypti*. **Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 1, p. 128, 2006.

VAREJÃO, J. B. M.; SANTOS, C. B.; REZENDE, H. R.; BEVILACQUA, L. C.; FALQUETO, A. Criadouros de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) em bromélias nativas na cidade de Vitória, ES. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 3, p. 238–240, 2005. DOI. 10.1590/s0037-86822005000300006.

VICENTINI, M.; MORAIS, G. dos S.; REBECHI, D.; RICHARDI, V. S.; SANTOS, G. S.; CESTARI, M. M.; NAVARRO-SILVA, M. A. Benzo(a)pyrene Exposure Causes Genotoxic and Biochemical Changes in the Midge Larvae of *Chironomus sancticarloi* Strixino & Strixino (Diptera: Chironomidae). **Neotropical Entomology**, v. 46, n. 6, p. 658–665, 2017. DOI. 10.1007/s13744-017-0505-3.

ZHOU, Q.; ZHANG, J.; FU, J.; SHI, J.; JIANG, G. Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. **Analytica Chimica Acta**, v. 606, n. 2, p. 135–150, jan. 2008. DOI. 10.1016/j.aca.2007.11.018.

CAPÍTULO I

EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS EM *Aedes (Stegomyia) aegypti* (LINNAEUS, 1762) (DIPTERA: CULICIDAE) EXPOSTOS A BUTIL BENZIL FTALATO

RESUMO

Os ftalatos são produtos químicos empregados como plastificantes, e por não reagirem quimicamente com os plásticos, podem ser facilmente liberados no ambiente. Os estudos que analisam o impacto dos ftalatos sobre as espécies aquáticas estão atraindo grande interesse, assim como o uso de *Aedes aegypti* como modelo biológico, graças a fatores como facilidade de criação em laboratório, ciclo de vida curto, amplo conhecimento da biologia e capacidade vetorial. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos genotóxicos, bioquímicos, morfológicos e nos parâmetros biológicos em *A. aegypti* em exposição a butil benzil ftalato. Populações de laboratório e de campo foram submetidas a seis concentrações de BBP variando de 0,001 mg.L⁻¹ a 2,0 mg.L⁻¹ em exposição aguda (48h), e às concentrações 0,001 mg.L⁻¹, 0,1 mg.L⁻¹ e 1,0 mg.L⁻¹ em exposições subcrônica (cinco dias) e crônica (15 dias). Foram realizados ensaios cometa a fim de verificar os danos ao DNA e ensaios com as enzimas AChE, EST- α , EST- β , GST, SOD e CAT e de danos de LPO para analisar as alterações metabólicas. Os parâmetros biológicos avaliados foram: sobrevivência, tamanho das asas, tempo de desenvolvimento, taxa de emergência de machos e fêmeas e razão sexual. O BBP provocou danos ao DNA nas populações de campo e laboratório em todos os tempos de exposição. A atividade da AChE e da EST- α foi induzida na população de campo, porém não teve alteração na população de laboratório. EST- β e GST tiveram respostas similares na população de campo, com o aumento da atividade em exposição aguda e não alteração em exposição crônica. Na população de laboratório, houve redução da EST- β em agudo e aumento em crônico, e respostas inversamente proporcionais para GST. CAT, SOD e LPO sofreram alterações, porém não foram respostas similares, embora estejam relacionadas. Em ambas as populações houve aumento do tamanho das asas de fêmeas expostas à concentração 0,001 mg.L⁻¹, redução na quantidade de larvas L1 que chegaram ao estágio L4 e do número de adultos; na população de campo ocorreu antecipação do estágio de pupa e emergência dos adultos associado a maior duração do tempo de desenvolvimento e razão sexual positiva para machos. Na população de laboratório, a maior taxa de emergência foi após 10 a 12 dias de eclosão das larvas, a razão sexual foi maior para os machos, e fêmeas na concentração 0,1 mg.L⁻¹ emergiram antes dos machos. Os resultados indicam que o BBP pode provocar alterações positivas e negativas no desenvolvimento de *Aedes aegypti* em diversos níveis de organização biológica, desde a escala celular à populacional.

Palavras-chave: desenvolvimento, ensaio enzimático, danos ao DNA.

1 INTRODUÇÃO

A produção e o uso de plásticos em larga escala ocorre desde aproximadamente 1950 e se deve, em grande parte, à criação de novas tecnologias para melhorar as propriedades dos produtos, como os aditivos lubrificantes, plastificantes, estabilizantes, pigmentos e corantes (HALDEN, 2010). Essas características permitiram ampla incorporação em produtos como embalagens, utensílios domésticos, brinquedos, móveis e tecidos (GEYER; JAMBECK; LAW, 2017).

O aumento da contaminação dos sistemas aquáticos, habitats terrestres e seus efeitos no organismo e no ecossistema acompanham o crescimento dos resíduos plásticos, pois os plásticos comumente utilizados não são biodegradáveis e se acumulam nos ambientes naturais, sendo a queima a principal forma de eliminação (ABDEL DAIEM et al., 2012; GEYER; JAMBECK; LAW, 2017).

Alguns dos responsáveis por essa contaminação são os ésteres de ftalato (PAEs), uma família de produtos químicos industriais empregados principalmente como plastificantes, e que também podem ser utilizados como inseticidas e solventes. Estão presentes na produção de PVC (cloreto de polivinil), embalagens, aparatos médicos, brinquedos, garrafas, cosméticos, lubrificantes, pesticidas, tintas, produtos de construção e de automóveis, equipamentos eletrônicos, entre outros (CUVILLIER-HOT et al., 2014; LENOIR et al., 2014; QU et al., 2014; MIHUCZ; ZÁRAY, 2016). Sua principal forma de entrada no ambiente se dá por meio de despejos industriais e lixiviação, principalmente dos plásticos de uso comum. São encontrados não apenas na água lixiviada, mas também nos lodos provenientes dos esgotos, na água superficial, no ar, nos sedimentos e nos alimentos (BONO-BLAY et al., 2012; WANG et al., 2012; LENOIR et al., 2014).

Os ftalatos não são considerados produtos químicos persistentes, pois são degradados do meio em alguns dias por fotoxidação e biodegradação aeróbica ou anaeróbica, porém são liberados em grandes quantidades e podem alcançar localmente elevadas concentrações no ambiente (LIANG et al., 2008; MIHUCZ; ZÁRAY, 2016).

Como os ftalatos são plastificantes externos semivoláteis que amaciam as resinas sem reagir quimicamente, eles tendem a se desprender do sistema polimérico e migrar lentamente do plástico para o meio com o qual está em contato, como para o ar por volatilização ou em água e outros solventes por dissolução, podendo ser facilmente liberados no ambiente durante a utilização ou eliminação dos produtos que apresentam ftalatos em sua composição (ABDEL DAIEM et al., 2012; MIHUCZ; ZÁRAY, 2016). Tendem a aderir em qualquer partícula orgânica e são adsorvidas pelas partículas atmosféricas que formam aerossóis. Como consequência, os animais são

amplamente expostos a estas substâncias, que entram no corpo por ingestão, inalação e/ou absorção dérmica (MARTINE et al., 2013; LENOIR et al., 2014).

Os ftalatos mais utilizados na produção industrial são: DEHP (di-(2-etilhexil) ftalato), DBP (dibutil ftalato) e o BBP (butil benzil ftalato). Nos Estados Unidos, desde 2008 estes compostos tiveram sua utilização permanentemente proibida para a produção de brinquedos e artigos para crianças. Na Europa, diversos ftalatos foram acrescentados à lista da União Europeia de Substâncias Altamente Preocupantes devido à sua toxicidade para o sistema reprodutivo, e desde 1999 o uso dos ftalatos é proibido em brinquedos infantis e desde 2010 em cosméticos (HUBINGER, 2010; ECHA, 2016). No Brasil, desde 2007 não devem ser utilizados como substâncias ou componentes de preparações em concentrações superiores a 0,1% em massa de material plastificado (INMETRO, 2016).

O composto butil benzil ftalato é comumente utilizado como plastificante em cloreto de polivinil, utilizado para fazer correias transportadoras de alimentos, carpete, couro artificial, lonas, acabamento automotivo, cones de trânsito e uma quantidade limitada na produção de luvas de vinil e adesivos. De acordo com a meia-vida obtida experimentalmente por Lertsirisopon et al. (2009), a degradabilidade abiótica do BBP foi de 58 a 480 dias sob irradiação solar e a bioacumulação de ftalatos foi observada em organismos aquáticos, sendo encontrados altos valores de bioconcentração em invertebrados (PLANELLÓ, 2011).

O BBP tem sido detectado em níveis baixos no ar, água e alguns alimentos (USEPA, 2014). Há ampla exposição de BBP aos seres vivos de acordo com dados de biomonitoramento de vários países. Em 2014, o BBP entrou na lista de compostos que apresentam riscos ambientais e à saúde humana da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 2014). Está listado no Grupo 3 da IARC (2014) com evidências insuficientes de carcinogenicidade em seres humanos e limitadas em animais experimentais. Segundo a Agência Europeia de Químicos (ECHA, 2019), o BBP é extremamente tóxico para a vida aquática, com efeitos a longo prazo. O levantamento mais recente foi realizado pela ECHA em 2007, analisando diversas regiões dos Estados Unidos e da Europa, e a concentração de BBP em água superficial variou de 0,01 $\mu\text{g.L}^{-1}$ a 3,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Porém, a análise relata que são necessários mais testes para regulamentar a quantidade permitida no meio ambiente. Desta forma, o Brasil também ainda não possui regulamentação.

Diversos estudos em humanos e outros mamíferos têm associado os ftalatos à ocorrência de problemas reprodutivos em animais silvestres e de laboratórios, provocando redução da fertilidade, aborto, defeitos congênitos, câncer de fígado e rins (LENOIR et al., 2014). Têm sido classificados como desreguladores endócrinos devido

à sua atividade estrogênica e antiandrogênica, perturbando o desenvolvimento sexual e a fertilidade dos indivíduos (CUVILLIER-HOT et al., 2014).

Por outro lado, poucos estudos têm analisado o impacto dos ftalatos sobre as espécies selvagens e, especialmente, sobre insetos, embora os efeitos desta poluição em habitats aquáticos estejam atraindo grande interesse (CUVILLIER-HOT et al., 2014). Em estudos realizados com espécies de formigas, foi observado que estas moléculas lipofílicas entram no organismo por via oral e aderidas à cutícula e sabe-se que são encontrados em todo o interior do inseto exposto ao contaminante, predominantemente no corpo gorduroso (LENOIR et al., 2012, 2014; CUVILLIER-HOT et al., 2014).

Lenoir et al. (2012) realizaram uma investigação sobre a presença de ftalatos em 17 espécies de formigas, no Orthoptera *Nemobius sylvestris* (Bosc d'Antic, 1792), no Coleoptera *Sternocoelis hispanus* (Rosenhauer, 1856) e no Hymenoptera *Apis mellifera* Linnaeus, 1758, e encontraram a substância em insetos em campo, que não tiveram contato direto com plásticos por meio de experimentos. Nas formigas, foram encontrados em glândulas de veneno, aparelho digestivo e ovários, mas estavam concentrados no corpo gorduroso, sugerindo a absorção através da cutícula. Cuvillier-Hot et al. (2014) observaram que em formigas operárias da espécie *Lasius niger* (Linnaeus, 1758), quando submetidas à exposição crônica do ftalato DEHP, houve redução da taxa de eclosão de ovos e da fertilidade das rainhas, devido à propriedade de desregulador endócrino do composto.

A exposição aos ftalatos provocou diferentes efeitos entre as diferentes espécies de insetos estudadas. Oehlmann et al. (2009) verificaram que o dietil ftalato (DEP) apresentou efeito inibidor de ecdisona em *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830) e que a exposição ao DEHP resultou no aumento do corpo de fêmeas em *Chironomus riparius* (Meigen, 1804) e aumento da expressão dos genes da hemoglobina em *Chironomus tentans* Fabricius, 1805. Também em trabalhos com *C. riparius*, Park e Kwak (2010) expuseram larvas ao DEHP e observaram retardo do desenvolvimento, deformidades nas peças bucais e alterações na forma do corpo e na viabilidade do ovos; Herrero et al. (2015) verificaram que o BBP apresentou efeito inibidor de ecdisona; Planelló et al. (2011) verificaram o efeito do BBP e do DEHP e observaram mudanças no desenvolvimento, na reprodução e na expressão de genes que codificam proteínas relacionadas ao estresse e ao sistema endócrino.

Devido às alterações provocadas pelo BBP em diversas espécies de insetos, à sua recente inclusão na lista da USEPA (2014) de compostos que apresentam riscos ambientais e às diversas propriedades tóxicas conhecidas de outros compostos de ftalato, o presente trabalho busca avaliar os efeitos das exposições aguda, subcrônica e crônica do butil benzil ftalato em *Aedes aegypti* em diferentes níveis organizacionais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Fluxograma de trabalho

A metodologia de trabalho está representada na figura 1. O estudo foi separado nas áreas de atuação de campo e de laboratório, de acordo com a origem das populações de *A. aegypti*, sendo as análises idênticas e passíveis de comparação.

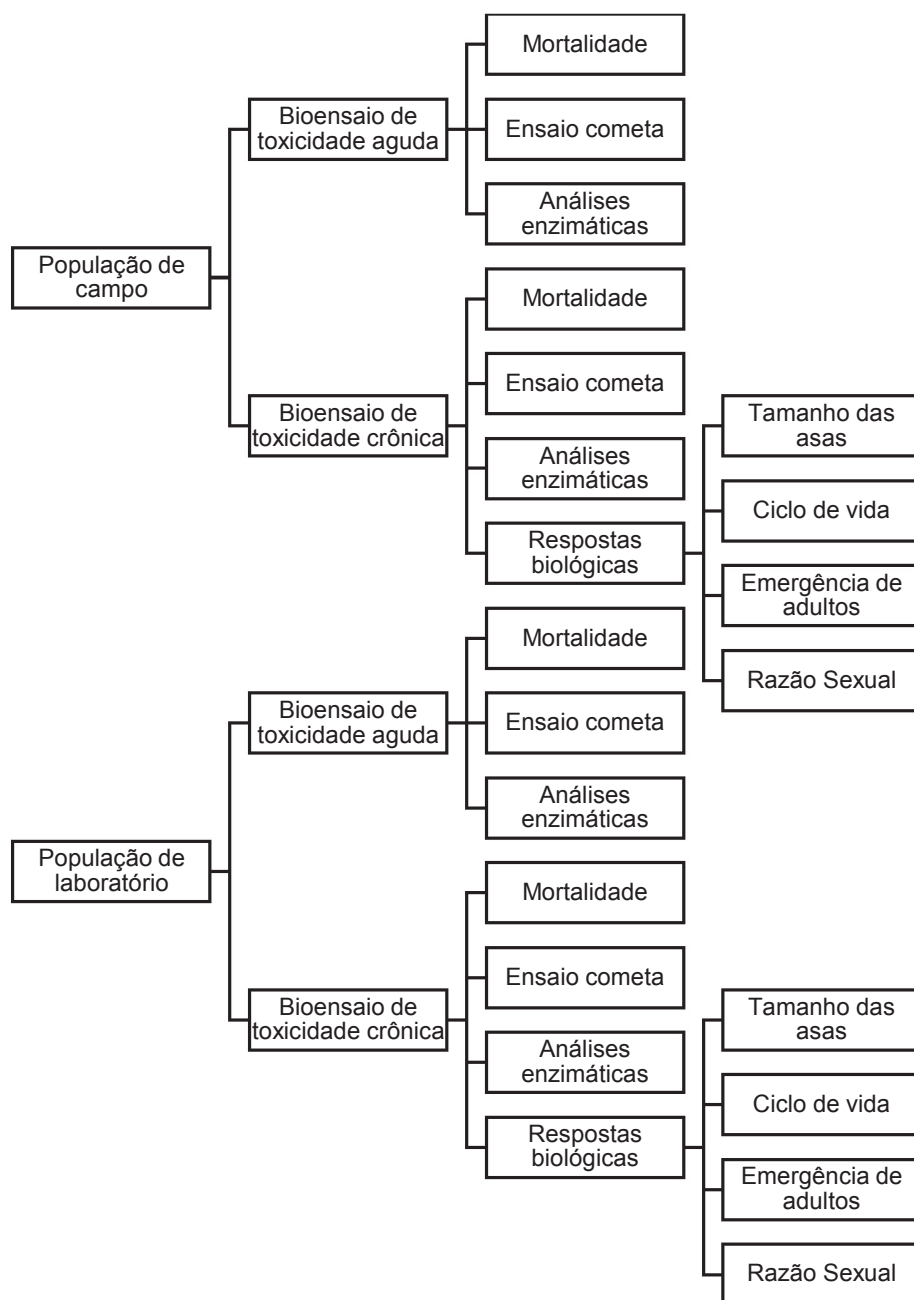


Figura 1. Fluxograma das atividades realizadas nos ensaios de toxicidade ao butil benzil ftalato.

2.2 Material Biológico

2.2.1 População de campo

A população de campo utilizada foi coletada em 2015 no município de Londrina, Paraná (Figura 2) e fornecida pelo Departamento de Biologia Animal e Vegetal da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Para a coleta de ovos, foram espalhadas ovitrampas (Figura 3A) pela cidade, que consistem em recipientes pretos contendo uma palheta de madeira em posição vertical e parcialmente preenchido com água, a fim de proporcionar um substrato para a oviposição das fêmeas de *Aedes aegypti* (GOMES, 1998). As palhetas que continham ovos, consideradas positivas, foram enviadas ao Laboratório de Morfologia e Fisiologia de Culicidae e Chironomidae (UFPR), onde foi realizada a criação.



Figura 2. Mapa do estado do Paraná com destaque para a localização do município de Londrina (em vermelho). Fonte: ITCG (2010).

Para a indução da eclosão das larvas, as palhetas foram colocadas em água desclorada, com fornecimento de ração de gato triturada diariamente como alimento, e depositados em câmaras do tipo B.O.D. sob condições de $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ de temperatura, 80% de umidade e fotoperíodo de 12/12 horas. Ao atingir o estágio de pupas, estas foram transferidas para gaiolas de criação (Figura 3B) até a emergência dos adultos, e então realizada a triagem das espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* e a contagem do número de adultos machos e fêmeas.

Os adultos permaneceram em gaiolas para a criação da geração F1, alimentados diariamente com solução de mel e água desclorada. Como fonte de alimentação sanguínea foram fornecidos camundongos *Mus musculus* utilizando os procedimentos aprovados pelo Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/BIO/UFPR (Protocolo nº 719). Após 72h da oferta do repasto sanguíneo, tempo necessário para a maturação dos ovos (GOMES et al, 2006), recipientes pretos contendo papel filtro umedecidos foram colocados nas gaiolas como substrato para a oviposição das fêmeas (Figura 3C). Os papéis com ovos (Figura 3D) foram colocados para secar e armazenados.



Figura 3. A. Ovitrapa com palheta de madeira para oviposição de *A. aegypti*; B. Gaiolas de criação; C. Recipiente para oviposição no interior das gaiolas; D. Papel filtro com ovos de fêmeas de *A. aegypti* após realização do repasto sanguíneo.

2.2.2 Colônia Rockefeller

A colônia de *Aedes aegypti* referência de suscetibilidade a inseticidas químicos, denominada Rockefeller, foi mantida em sala isolada no Laboratório de Morfologia e Fisiologia de Culicidae e Chironomidae (UFPR) sob as mesmas condições de criação da população de campo.

A denominação utilizada no trabalho para fazer referência a esta população foi população de laboratório.

2.3 Ensaios de toxicidade

2.3.1 Condições gerais dos ensaios

Os papéis filtro contendo os ovos foram colocados para eclosão em água reconstituída (Solução de estoque I [sulfato de cálcio (CaSO_4) a $8,7 \mu\text{M}$; 1000 ml água destilada] e solução de estoque II [Cloreto de potássio (KCl) a $2,7 \mu\text{M}$; bicarbonato de

sódio (NaHCO_3) a $57 \mu\text{M}$; sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) a $24,7 \mu\text{M}$; 1000 ml água destilada], nos parâmetros: dureza de 16 mg.L^{-1} ; pH entre 7,2 e 7,6 e condutividade de $160 \mu\text{S/cm}$. Após 24h, parte das larvas foi separada para a realização dos ensaios de toxicidade subcrônica e crônica e as demais mantidas em criação até o quinto dia para realização dos ensaios de toxicidade aguda.

A solução de uso de butil benzil ftalato (10.000 mg.L^{-1}) foi preparada por meio da diluição da solução estoque de BBP (98% da Sigma Aldrich®; Lote 250-ML) em etanol (P.A.). Foram utilizados como controles uma solução apenas com água reconstituída (controle água) e outra solução contendo água reconstituída e etanol (P.A) (controle solvente).

Os parâmetros dos ensaios e as concentrações das soluções foram iguais para ambas as populações de *A. aegypti* avaliadas. Ao início e ao final de cada ensaio foram coletados dados das variáveis físico-químicas que podem afetar a expressão da toxicidade (COSTA et al., 2008), como oxigênio dissolvido, temperatura, salinidade, condutividade, produtos sólidos totais e pH.

2.3.2 Ensaios de Toxicidade Aguda

Os ensaios de exposição aguda com as populações de campo e laboratório foram realizados em recipientes de vidro de 300 ml, em quatro réplicas contendo 20 larvas de *A. aegypti* em terceiro instar final ou início do quarto instar para cada concentração. Foram realizadas três repetições dos ensaios a fim de obter a quantidade de amostras necessárias para os ensaios genotóxicos e bioquímicos, sendo utilizadas 240 larvas por grupo, 1.920 para cada população, totalizando 3.840 larvas. As larvas foram mantidas em câmara do tipo B.O.D. sob as mesmas condições da criação, porém, após a exposição ao BBP, não houve mais o fornecimento de alimento. As leituras dos testes foram realizadas após 48h e calculada a taxa de mortalidade das larvas.

Para a escolha das concentrações utilizadas nos ensaios, foram feitos testes preliminares com sete diluições entre $0,001 \text{ mg.L}^{-1}$ e 20 mg.L^{-1} , passíveis de serem encontradas na natureza e já usadas em estudos com dípteros (HERRERO, 2015). Após análise dos dados de mortalidade, foram escolhidas as concentrações subletais apresentadas na Tabela I. Os dados dos parâmetros físico-químicos coletados no início e no final dos ensaios estão apresentados na Tabela II.

Tabela I. Concentrações subletais de butil benzil ftalato e etanol absoluto (99,5%) utilizadas nos ensaios de toxicidade aguda com as populações de campo e de laboratório. CA = controle água; CS = controle solvente; Sol = solução de BBP preparada para o uso diário no ensaio.

		Concentrações (mg.L ⁻¹)	BBP (µl)	Solvente (µl)	Volume total (ml)
	CA	-	0	0	100
	CS	-	0	200	100
Sol 1	C1	0,001	10	190	100
	C2	0,01	100	100	100
Sol 2	C3	0,1	5	195	100
	C4	0,5	25	175	100
	C5	1,0	50	150	100
	C6	2,0	100	100	200

Tabela II. Média dos parâmetros físico-químicos em período inicial e final do ensaio agudo em exposição a BBP nas populações de campo e de laboratório. TDS = produtos sólidos totais; DO = oxigênio dissolvido.

Período	pH	Temperatura (°C)	Condutividade (µS)	Salinidade (ppmS)	TDS (mg.L ⁻¹)	DO (mg.L ⁻¹)
Inicial	7,2	20,9	72,9	33,6	50,3	6,52
Final	7,1	21,4	83,3	38,6	58,5	6,6

2.3.3 Ensaios de Toxicidade Subcrônica e Crônica

Os ensaios subcrônicos e crônicos com as populações de campo e de laboratório foram realizados em aquários de vidro de dimensões 10 cm X 21 cm X 10,5 cm, em três réplicas contendo 700 ml de água reconstituída, 5 ml de ração líquida (25 g ração Tetramin®; 1000 ml de água destilada) e 100 larvas de *A. aegypti* de primeiro instar para cada concentração. Foram realizadas três repetições dos ensaios a fim de obter a quantidade de material necessário para as análises posteriores, sendo utilizadas 900 larvas por concentração, 4.500 para cada população, totalizando 9.000 larvas. Os ensaios foram realizados mantendo-se as mesmas condições da criação, porém com fornecimento de 2 ml de ração líquida a cada 48h, sob aeração constante para evitar a proliferação de fungos.

O ensaio subcrônico teve duração de cinco dias, em que parte das larvas foi retirada e armazenada para os ensaios genotóxicos e bioquímicos. O ensaio crônico teve duração de 15 dias, no qual a outra parte das larvas foi mantida nos aquários até

o estágio de pupa, contabilizadas e colocadas em recipientes de coleta até a emergência dos adultos. Estes foram armazenados para avaliação dos parâmetros biológicos.

Para a escolha das concentrações utilizadas nos ensaios, foram feitos testes preliminares com as mesmas diluições utilizadas nos ensaios agudos. Após análise dos dados de mortalidade, foram escolhidas a concentração mais baixa e duas intermediárias que fossem subletais apresentadas na Tabela III. Semanalmente, a solução do ensaio foi substituída por uma nova, para evitar alteração da concentração do BBP, evaporação e aumento da turbidez da água. Os dados dos parâmetros físico-químicos coletados no início e no final dos ensaios estão apresentados na Tabela IV.

Tabela III. Concentrações subletais de butil benzil ftalato e etanol absoluto (99,5%) utilizadas nos ensaios de toxicidade subcrônica e crônica com as populações de campo e de laboratório. CA = controle água; CS = controle solvente; Sol = solução de BBP preparada para o uso diário no ensaio.

		Concentrações (mg.L ⁻¹)	BBP (µl)	Solvente (µl)	Ração líquida (µl)	Volume final (ml)
	CA	-	0	0	5000	700
	CS	-	0	1450	5000	700
Sol 1	C1	0,001	10	1443	5000	700
Sol 2	C2	0,1	70	1380	5000	700
	C3	1,0	700	750	5000	700

Tabela IV. Média dos parâmetros físico-químicos em período inicial e final do ensaio crônico em exposição a BBP nas populações de campo e de laboratório. TDS = produtos sólidos totais; DO = oxigênio dissolvido.

Período	pH	Temperatura (°C)	Condutividade (µS)	Salinidade (ppmS)	TDS (mg.L ⁻¹)	DO (mg.L ⁻¹)
Inicial	6,94	19,5	71,2	34,4	50,8	7,9
Final	6,98	21,9	96,9	47,4	62,4	2,6

2.4 Biomarcador de genotoxicidade

A técnica utilizada para detecção de danos ao DNA nas populações de campo e laboratório, após exposições aguda e subcrônica, foi o ensaio cometa alcalino, realizado no Laboratório de Mutagênese Ambiental e Citogenética Animal (UFPR) e seguindo o protocolo de Lee e Choi (2006) com adaptações por Moraes et al. (2014).

Larvas de *A. aegypti* foram acondicionadas em 500 µL de soro bovino fetal por no máximo 48h, homogeneizadas e centrifugadas a 1000 rpm por cinco minutos. Após

descartar o sobrenadante, as células foram ressuspensas em vórtex. 100 µL da suspensão foram adicionadas a 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) a 1% (0,1 g de LMP; 20 ml de PBS) e espalhadas em lâminas previamente recobertas por uma camada de agarose normal a 1,5% (1,5 g; 100 ml de PBS). Estas foram cobertas com lamínulas e mantidas sob refrigeração por um período de 10 a 20 min. Posteriormente, as lamínulas foram retiradas e as lâminas colocadas em solução de lise (10 mM Tris; 100 mM ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 2,5 M cloreto de sódio (NaCl); dimetilsulfóxido (DMSO) a 10%). Após 24h, as lâminas foram retiradas da solução de lise e mantidas em solução alcalina com pH>13 (300 mM NaOH; 1 mM EDTA) por 30 min para a desnaturação do DNA. Em seguida, foram submetidas à eletroforese a 4 °C (25 V e 300 mA) por 25 min. Ao término da corrida, as lâminas foram neutralizadas com 0,4 M Tris (pH = 7,5) por 15 min e fixadas com etanol absoluto por cinco minutos. Após secas, as lâminas foram coradas com 15 µL de Brometo de Etídio (20 µg.ml⁻¹).

Neste teste, após as células inseridas na agarose passarem pela lise celular e pela eletroforese, o DNA fragmentado migra para o pólo positivo da cuba de eletroforese, enquanto o DNA intacto permanece agrupado, formando uma cauda semelhante a um cometa, que dá nome ao teste (AZQUETA et al., 2011a).

As lâminas foram observadas em teste cego, em microscópio de epifluorescência sob aumento de 400x. Em cada lâmina analisada foi determinado o nível de dano correspondente utilizando a classificação de Azqueta et al. (2011b) (0 = sem dano aparente; 1 = dano pequeno; 2 = dano médio; 3 = dano extenso; 4 = dano máximo) e o escore calculado de acordo Koppen et al. (2017).

Para cada grupo avaliado foram produzidas 10 lâminas com pools de seis larvas cada, totalizando 1.560 larvas, sendo 960 para os ensaios de toxicidade aguda e 600 para os ensaios de toxicidade subcrônica. Foram examinadas 50 nucleóides por lâmina (Tabela V).

Tabela V. Número de larvas de laboratório e campo em exposições aguda e subcrônica utilizadas nos ensaios cometa.

População	Tempo de exposição	Número grupos	Lâminas	Larvas por pool	Total Larvas	Número nucleóides por lâmina	Número total de células
Campo	Agudo	8	10	6	480	50	4.000
	Subcrônico	5	10	6	300	50	2.500
Laboratório	Agudo	8	10	6	480	50	4.000
	Subcrônico	5	10	6	300	50	2.500
Total					1.560		13.000

2.5 Bioindicadores bioquímicos

As larvas retiradas dos ensaios de toxicidade aguda e subcrônica foram separadas em 20 *pools* de cinco larvas por concentração e grupos controle, armazenadas ainda vivas, a seco, em microtubos de 1,5 ml e congeladas a -80 °C de temperatura.

Para a preparação dos ensaios enzimáticos, o *pool* com as larvas foi homogeneizado em 620 µl de água deionizada (Milli-Q®), com auxílio de homogeneizador automático. As alíquotas para o ensaio de AChE foram separadas e o restante da amostra centrifugado a 10.850 rpm por 60 segundos em centrífuga refrigerada a 4 °C. As reações para cada enzima foram realizadas em triplicata em microplacas transparentes de 96 poços e a absorbância final lida em espectrofotômetro de microplacas.

Cada enzima apresenta um protocolo, um tempo de reação e uma unidade de medida específica. Durante todo o processo, os tubos e as microplacas contendo os homogenatos foram mantidos em gelo a fim de inibir a formação de EROS e reduzir a proteólise.

2.5.1 Acetilcolinesterase (AChE)

A partir do volume total de homogenato, alíquotas de 25 µl foram distribuídas em três réplicas em microplaca, adicionados 200 µl de DTNB (5,5-Ditio-bis-2nitro-benzoato; 0,75 mM) e 50 µl de ATC (iodeto de acetiltiocolina; 10 mM), e encubadas por 30 min em temperatura e luz ambiente. A leitura cinética foi feita em comprimento de onda de 405 nm, a cada minuto durante cinco minutos, de acordo com o método de Ellman et al. (1961) modificado para microplaca por Dizer et al. (2001). Os resultados foram expressos em nmol/min/mg proteína.

2.5.2 Esterases α e β (α -EST e β -EST)

Os ensaios para α -EST e β -EST seguiu o protocolo de Valle e Montella (2006), com reagentes similares utilizados para ambas as enzimas, havendo, no entanto, as substituições de α -naftil e α -naftol na enzima α -EST por β -naftil e β -naftol em β -EST.

O método baseia-se no consumo do substrato α -naftil pela enzima α -EST transformando-o em α -naftol. Ao acrescentar o corante Fast blue, a reação cessa imediatamente e a quantidade do produto α -naftol pode ser medida por meio da coloração produzida (VALLE; MONTELLA, 2006).

Portanto, 10 µl de amostra foram distribuídas em três réplicas em microplaca e adicionados 200 µl de alfa-naftil acetato/Na fosfato (0,3 mM). Após 15 min de incubação em luz e temperatura ambiente, foram acrescentados 50 µl de Fast blue (0,3%), incubado por cinco minutos e realizada a leitura *endpoint* a 570 nm. Foi feita curva padrão com α-naftol (0,3 mg.L⁻¹) para a conversão dos valores de absorbância em conteúdo de α-naftol. Os resultados foram expressos em nmol de alfa naftol/mg de proteína/min.

2.5.3 Glutathione S-Transferase (GST)

O protocolo utilizado para GST foi o proposto por Hemingway (1998). Alíquotas de 15 µl de amostra foram distribuídas em três réplicas em microplaca e acrescentados 195 µl da solução de reação composta por CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno; 21 mM) e GSH (glutathione reduzida; 10 nM). A absorvidade molar do produto da reação foi 4,39 mM⁻¹cm⁻¹. A leitura cinética foi feita em comprimento de onda de 340 nm, a cada minuto durante 20 min e a atividade foi expressa em nmoles/mg ptn/min, ou seja, quantidade do produto de reação gerado por minuto, por mg de proteína.

2.5.4 Catalase (CAT)

O protocolo utilizado para CAT seguiu o proposto por Aebi (1984), com modificações. Alíquotas de 5 µl de amostra foram distribuídas em três réplicas em microplaca e acrescentados 295 µl de solução reação a 80mM (Tampão Tris 1M/EDTA 5mM, peróxido de hidrogênio 3% e água Milli-Q®). O método consiste no consumo de peróxido de hidrogênio exógeno através da atividade da catalase, gerando oxigênio e água. O coeficiente de absorvidade molar para H₂O₂ de 40 M⁻¹cm⁻¹ foi utilizado para calcular a atividade da enzima (HUGO AEBI, 1984). A reação foi lida em comprimento de onda de 240 nm a cada 15 seg por cinco minutos e a atividade expressa em µmol/min/mg proteína.

2.5.5 Peroxidação Lipídica (LPO)

A análise da peroxidação lipídica (LPO) ocorre pela avaliação da concentração de hidroperóxidos do ensaio FOX seguindo a metodologia de Jiang et al. (1992). Em microtubos de 1,5 ml, foram adicionados 70 µl de metanol P.A. a 70 µl de amostra, centrifugados a 7.020 rpm por cinco minutos a 4 °C de temperatura. Foram transferidos 100 µl de sobrenadante para um novo microtubo e acrescentados 900 µl de reativo de FOX 2, composto por solução metanólica (laranja de xilenol 0,1 mM; BHT 4 mM (hidroxitolueno butilado cristalino); metanol) e solução de sulfato ferroso amoniacal

2500 μM (sulfato ferroso amoniacal; ácido sulfúrico 250 mM). As amostras foram incubadas no escuro por 30 min, sendo agitados a cada três minutos. Em seguida, 300 μl desta solução foram distribuídas em microplacas em três réplicas e lidas em comprimento de onda de 560 nm. Para determinar a concentração de hidroperóxidos, o coeficiente de absorvidade molar do H_2O_2 utilizado foi de $4.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Os resultados foram expressos em concentração de hidroperóxidos/mg proteína.

2.5.6 Superóxido-Dismutase (SOD)

A análise da atividade da SOD foi realizada seguindo o método proposto por Gao (1998). Em microtubos de 1,5 ml, foram adicionados, em duplicata, 40 μl de amostra, 885 μl de tampão (Tris-base 1 M; EDTA 5 mM) e 50 μl de pirogalol (20 mM), incubados por 30 minutos, e acrescentados 25 μl de HCl (1N) para a interrupção da reação. Em microplaca, foram adicionados 300 μl da amostra em triplicata. A leitura *endpoint* foi feita em comprimento de onda de 440 nm. Um controle por amostra foi realizado simultaneamente com adição de todos os reagentes, porém sem incubação. A quantidade de SOD que inibiu a reação em 50% (IC50) equivale a 1 unidade (U) de SOD. Os resultados foram expressos em U de SOD/mg de proteína.

2.5.7 Proteína Total (PTN)

A quantidade de proteína total seguiu o método descrito por Bradford (1976). Alíquotas de 10 μl de amostra foram distribuídas em três réplicas em microplaca, seguidos pela adição de 250 μl do reativo Bradford diluído em água Milli-Q® (1:5). Para o controle positivo, foram acrescentados também 10 μl de BSA (albumina sérica bovina). A leitura *endpoint* ocorreu a 620 nm. A conversão de valores de absorbância em valores de proteína total foi realizada com a curva padrão de BSA em diferentes concentrações.

2.6 Parâmetros biológicos

Para verificar possíveis alterações morfológicas, foram avaliadas as médias dos centroides das asas direitas de machos e fêmeas provenientes dos ensaios de toxicidade crônica apenas da população de campo.

O tamanho do centroide é a raiz quadrada da soma do quadrado das distâncias entre os marcos, ou seja, uma medida da variação geral do tamanho das asas. Desconsidera as variáveis alométricas, portanto seu uso é melhor empregado do que a simples medida do comprimento da asa (SLICE, 2001; DHIVYA; MANIMEGALAI, 2013).

A metodologia utilizada para a retirada das asas seguiu o protocolo desenvolvido no Laboratório de Morfologia e Fisiologia de Culicidae e Chironomidae (LAMFIC), UFPR. As asas direitas foram retiradas com o auxílio de estiletes mediante observação em microscópio estereoscópico Stemi SV6 Zeiss, imersas em solução de hipoclorito de sódio (KOH 10%) por um minuto para remoção das escamas, transferidas para etanol absoluto e montadas em preparação semipermanente entre lâmina e lamínula.

As imagens das asas (Figura 4) foram capturadas em vista dorsal utilizando a câmera Axion Cam ERc5s acoplada a microscópio Carl Zeiss Discovery V20, em aumento de 30x. Primeiramente, as imagens foram agrupadas e modificadas para o formato de arquivo adequado (extensão tps) utilizando o programa TpsUtil 1.74 (ROHLF, 2017). Sobre cada imagem, foram tomadas as coordenadas posicionais de 14 marcos anatômicos do tipo I, escolhidos de forma que abrangessem a base, a região central e o ápice das asas, inseridos nos pontos de convergência e divergência das veias alares (Tabela VI), utilizando-se o software TpsDig 2.31 (ROHLF, 2017). No programa MorphoJ 1.06d (KLINGENBERG, 2014) foi realizada a análise do tamanho dos centroides e os dados logaritmizados para a realização da análise estatística.

Tabela VI. Descrição dos marcos anatômicos inseridos nos pontos de convergência e divergência das veias alares de *Aedes aegypti*, seguindo a nomenclatura morfológica de Forattini (1996).

Localização dos marcos anatômicos	
1 Intersecção da veia cubital anterior (CuA) e cubital posterior (CuP)	8 Ápice da veia radio anterior (R ₁)
2 Junção da margem posterior da célula anal anterior (ca ₁) e margem posterior do lobo jugal (jl)	9 Intersecção da veia costa (C) com veia subcosta (Sc)
3 Ápice da veia anal (A)	10 Bifurcação da veia cúbito anterior (CuA) em cubital anterior um (CuA ₁) e dois (CuA ₂)
4 Ápice da veia cubital posterior (CuA ₂)	11 Encontro da veia transversal média-cúbito (m-cu) com a veia cúbito anterior (CuA ₁)
5 Ápice da veia cubital anterior (CuA ₁)	12 Intersecção da veia transversal radio-média (r-m) com radial (R ₄₊₅)
6 Bifurcação da veia media na mediana anterior (M ₁₊₂)	13 Bifurcação da veia radial (R ₂₊₃) em radial dois (R ₂) e radial três (R ₃)
7 Ápice da veia radial (R ₃)	14 Bifurcação da veia média (M) em média anterior (M ₁₊₂) e posterior (M ₃₊₄)



Figura 4. Asa de *A. aegypti* digitalizada indicando a posição dos 14 marcos anatômicos (LM) utilizados.

Para a análise do tempo de desenvolvimento, durante os ensaios de toxicidade crônica (15 dias), foram registradas as datas de início da exposição, de mudança para o estágio de pupa e de emergência dos adultos, tanto machos quanto fêmeas. Paralelamente, foi feita a contagem do número de indivíduos em cada estágio de desenvolvimento. Os adultos, ao final do bioensaio, foram retirados do recipiente de coleta e armazenados separadamente por sexo a -20°C .

Por meio da análise desses parâmetros foi possível determinar o tempo de desenvolvimento, atrasos no ciclo de vida, mortalidade larval, razão sexual e densidade populacional dos organismos.

2.7 Análise Estatística

Em todos os ensaios, os grupos controles água e solvente foram comparados por meio do teste-t no programa Past 3.13 e descartado o controle água quando $p > 0,05$, ou mantidos ambos os controles quando $p < 0,05$.

As análises estatísticas para o ensaio cometa foram Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunnett ($p < 0,05$), realizadas no programa Graphpad Prism 8.0. Os gráficos foram gerados no programa Excel 2013. Para o ensaio de BBP da população de campo em exposição subcrônica, os controles água e solvente foram significativamente diferentes, portanto foram feitas as análises utilizando os controles separadamente comparados aos tratamentos.

Para a razão sexual foi utilizado o teste qui-quadrado (χ^2) ($p < 0,05$) e para os ensaios bioquímicos, tamanho das asas e demais parâmetros biológicos, a normalidade e a homogeneidade da variância foi verificada pelo teste Shapiro-Wilk e os tratamentos analisados por meio do teste de variância ANOVA de um fator com pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). Todas as análises foram realizadas no programa Past 3.13 e os gráficos gerados no programa Excel 2013.

3 RESULTADOS

3.1 Mortalidade

Em exposição aguda ao BBP, não houve mortalidade das larvas de campo (Figura 5A) e de laboratório (Figura 5B) nos grupos controles água e solvente. Nos tratamentos, a mortalidade foi menor que 1% em ambas as populações.

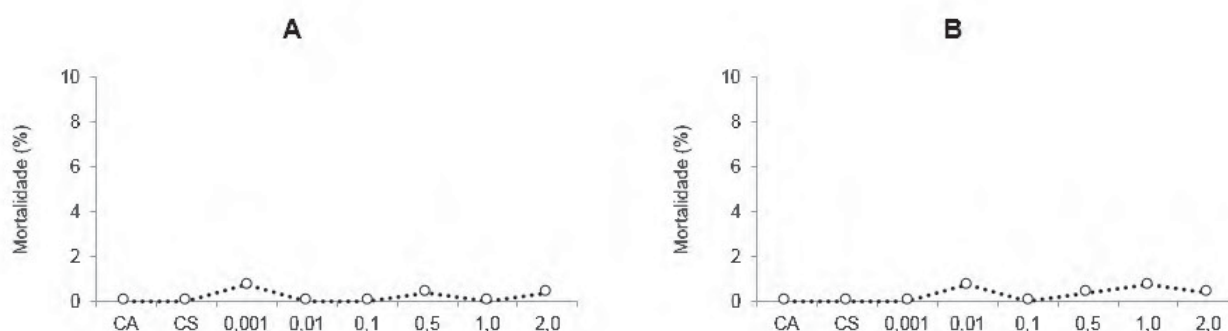


Figura 5. Porcentagem média de mortalidade de larvas de *A. aegypti* em exposição a concentrações nominais de BBP (em mg.L⁻¹) e grupos controles água (CA) e solvente (CS). (A) Exposição aguda (48h) em larvas de campo; (B) Exposição aguda (48h) em larvas de laboratório (ANOVA Kruskal-Wallis com pós-teste de Tukey's; $p < 0,05$).

3.2 Biomarcador de genotoxicidade

O composto butil benzil ftalato ocasionou danos ao DNA de larvas de *A. aegypti* em exposições aguda e subcrônica. Em exposição aguda, em comparação ao grupo controle, os danos foram significativos apenas na maior concentração (2,0 mg.L⁻¹) em larvas de campo (Figura 6A) e nas três maiores concentrações (0,5mg.L⁻¹, 1,0 mg.L⁻¹ e 2,0 mg.L⁻¹) em larvas de laboratório (Figura 6B).

Em exposição subcrônica em larvas de campo (Figura 6C), os grupos controles água e solvente foram significativamente diferentes entre si, portanto foram realizadas análises comparativas entre os tratamentos e os grupos controles separadamente. Todas as concentrações sofreram aumento significativo de dano ao DNA em relação ao controle água e apenas a maior concentração (1,0 mg.L⁻¹) em relação ao controle solvente. Em exposição subcrônica em larvas de laboratório (Figura 6D) aumentos significativos de danos foram observados em todas as concentrações em relação ao controle solvente.

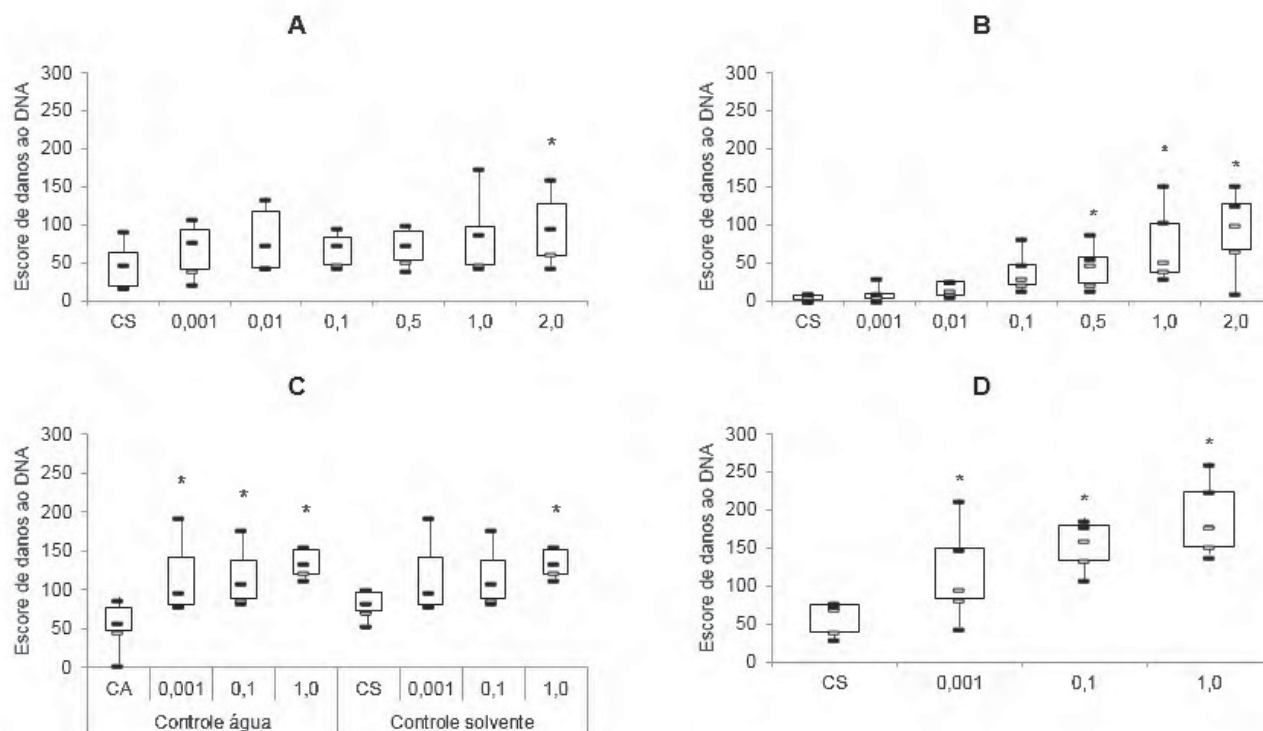


Figura 6. Escore de danos ao DNA em larvas de *A. aegypti* em exposições aguda (48h) e subcrônica (5 dias) a concentrações nominais de BBP (em mg.L^{-1}) e grupos controles água (CA) e solvente (CS) ($n=10$), indicando mediana, primeiro quartil, terceiro quartil, mínimo e máximo. (A) Exposição aguda em larvas de campo; (B) Exposição aguda em larvas de laboratório; (C) Exposição subcrônica em larvas de campo; os grupos controles água e solvente são estatisticamente diferentes; (D) Exposição subcrônica em larvas de laboratório. Asteriscos representam diferença significativa entre os grupos controles água ou solvente e os tratamentos (ANOVA Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunnett; $p<0,05$).

3.3 Biomarcadores bioquímicos

A análise enzimática da população de campo e de laboratório, em exposição aguda a BBP, foram submetidas às concentrações $0,001 \text{ mg.L}^{-1}$; $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$; $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$; $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$; $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ e $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ (Figuras 7 e 8). Em exposição subcrônica as concentrações expostas foram $0,001 \text{ mg.L}^{-1}$; $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ (Figuras 9 e 10).

A população de campo em exposição aguda apresentaram aumento significativo na atividade das enzimas AChE, GST e CAT apenas na concentração mais alta ($2,0 \text{ mg.L}^{-1}$) em relação aos grupos controles (Figuras 7A, 7D e 7E). A atividade da EST- α na concentração $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ teve aumento significativo em relação somente aos grupos controles e $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ em relação aos grupos controles e demais concentrações (Figura 7B). A enzima EST- β apresentou aumento significativo em relação aos controles nas três maiores concentrações ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$; $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$; $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$), sendo que $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ foi diferente de todos os tratamentos (Figura 7C). A atividade da SOD não apresentou

comportamento homogêneo, diferiu entre os controles água e solvente e 0,01 mg.L⁻¹ foi a única concentração que reduziu em relação ao controle água, enquanto as concentrações 0,5 mg.L⁻¹ e 2,0 mg.L⁻¹ aumentaram em relação ao controle solvente (Figura 7F). A quantidade de hidropéroxidos apresentou aumento em relação aos controles e tratamentos na concentração 0,1 mg.L⁻¹ e redução em relação aos controles na concentração 1,0 mg.L⁻¹ (Figura 7G).

Para a população de laboratório em exposição aguda ao BBP, a atividade de AChE nas concentrações 0,01 mg.L⁻¹, 0,5 mg.L⁻¹, 1,0 mg.L⁻¹ e 2,0 mg.L⁻¹ sofreram redução em relação a CS (Figura 8A). Na enzima EST- α houve redução da atividade em todas as concentrações quando comparadas aos grupos controles, exceto na concentração mais baixa (0,001 mg.L⁻¹) em que ocorreu aumento (Figura 8B). Em EST- β , os grupos controles foram diferentes entre si, e as três maiores concentrações (0,5 mg.L⁻¹, 1,0 mg.L⁻¹ e 2,0 mg.L⁻¹) sofreram redução em relação aos controles e demais concentrações (Figura 8C). A atividade de GST foi diferente entre os dois grupos controles e a maior atividade ocorreu na maior concentração (2,0 mg.L⁻¹) em relação aos grupos controles e demais tratamentos (Figura 8D). A atividade de CAT foi reduzida na maior concentração (1,0 mg.L⁻¹) (Figura 8E) e de SOD foi maior na menor concentração (0,001 mg.L⁻¹) (Figura 8F) em relação aos grupos controles. A quantidade de danos de LPO foram mais elevadas nas concentrações 0,001 mg.L⁻¹ e 2,0 mg.L⁻¹ em relação aos grupos controles e demais tratamentos (Figura 8G).

Em exposição subcrônica ao BBP na população de campo, as concentrações avaliadas tiveram aumento significativo em relação aos grupos controles na enzima AChE (Figura 9A). Em EST- α , apenas a concentração mais alta (1,0 mg.L⁻¹) aumentou em relação aos controles (Figura 9B). Em EST- β , a atividade de CS foi significativamente menor quando comparada a CA, no entanto, os três tratamentos não diferiram entre si e entre os controles (Figura 9C). GST não apresentou diferença na atividade entre controles e tratamentos (Figura 9D). A atividade da CAT no CS e nas três concentrações avaliadas reduziu em relação a CA (Figura 9E). A atividade de SOD aumentou em 0,1 mg.L⁻¹ e 1,0 mg.L⁻¹, relacionadas aos controles e à concentração mais baixa (0,001 mg.L⁻¹) (Figura 9F). Em LPO, os tratamentos não diferiram dos grupos controles (Figura 9G).

A população de laboratório em exposição subcrônica ao BBP apresentaram aumento significativo na atividade de AChE no CS quando comparadas ao CA e aos tratamentos (Figura 10A). Já na EST- α (Figura 10B) e na GST (Figura 10D), o controle solvente e os tratamentos sofreram redução em relação ao CA. A atividade de EST- β aumentou no CS e nos tratamentos quando comparada ao CA, sendo que a maior atividade ocorreu na maior concentração (1,0 mg.L⁻¹) (Figura 10C). A atividade de CAT

não diferiu entre controles e tratamentos (Figura 10E). A atividade da SOD na concentração $0,001 \text{ mg.L}^{-1}$ teve aumento significativo em relação a $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ (Figura 10F). A quantidade de dano por LPO não diferiu entre os controles e $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$, e os tratamentos $0,001$ e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ não diferiram entre si, porém aumentaram em relação aos demais tratamentos (Figura 10G).

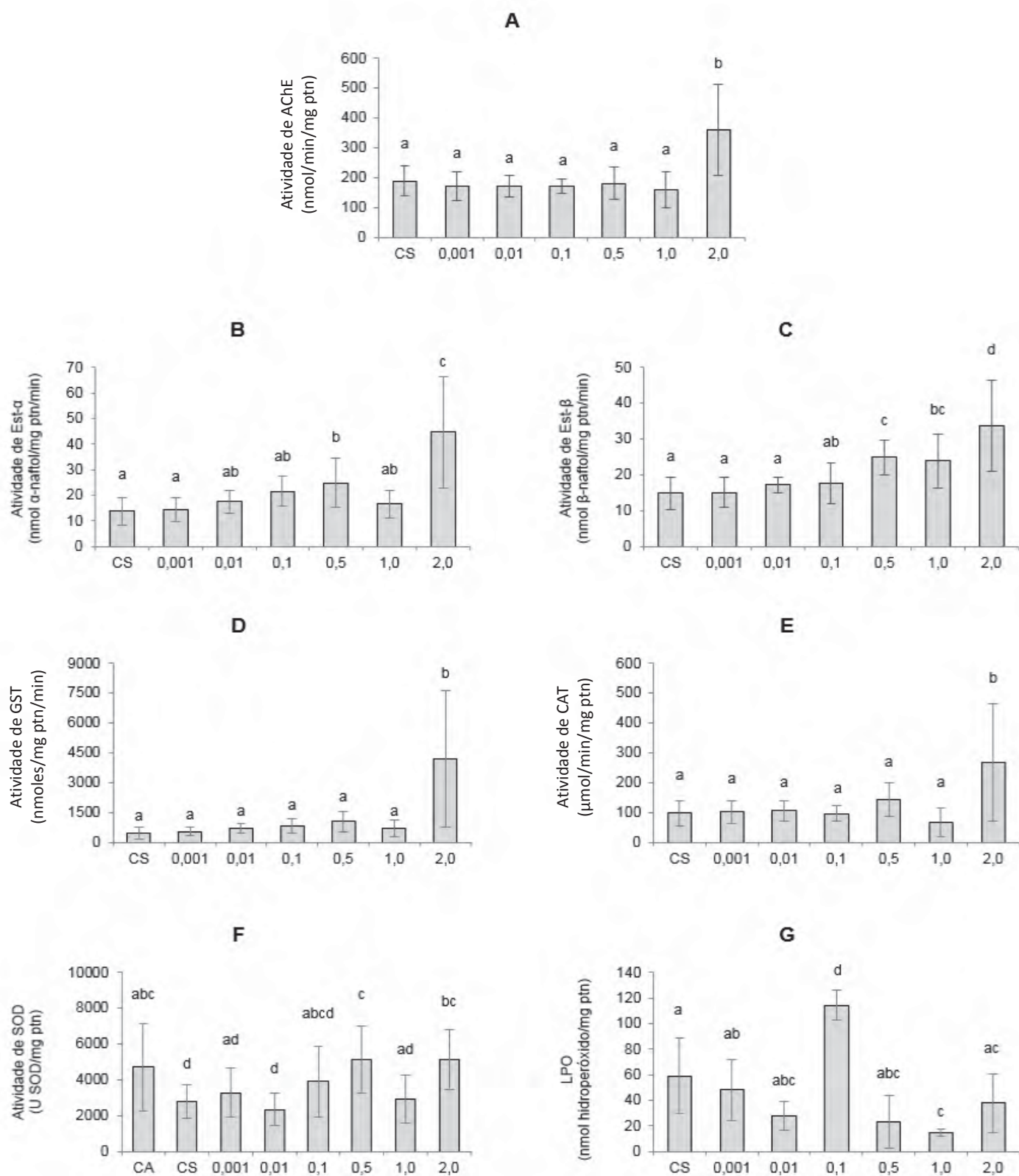


Figura 7. Média e desvio padrão da atividade das enzimas (A) AChE, (B) EST-α, (C) EST-β, (D) GST, (E) CAT, (F) SOD e (G) quantidade de hidróperóxido (LPO) em larvas de campo de *A. aegypti* após exposição aguda (48h) a concentrações nominais de BBP (em mg.L⁻¹) e grupos controles água (CA) e solvente (CS). Letras diferentes indicam alterações significativas (ANOVA com pós-teste de Tukey's; p<0,05).

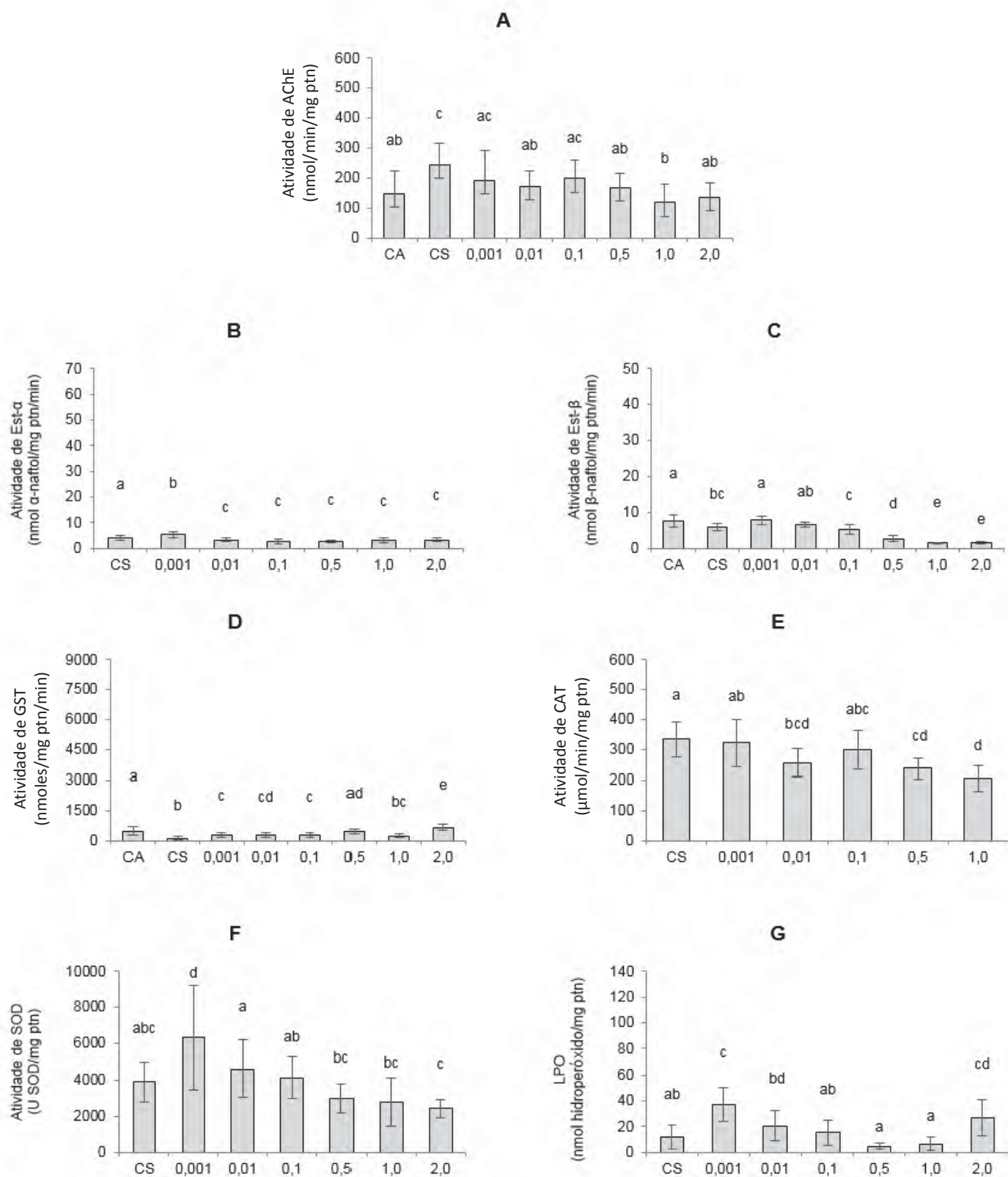


Figura 8. Média e desvio padrão da atividade das enzimas (A) AChE, (B) EST- α , (C) EST- β , (D) GST, (E) CAT, (F) SOD e (G) quantidade de hidróperóxido (LPO) em larvas de laboratório de *A. aegypti* após exposição aguda (48h) a concentrações nominais de BBP (em mg.L⁻¹) e grupos controles água (CA) e solvente (CS). Letras diferentes indicam alterações significativas (ANOVA com pós-teste de Tukey's; $p < 0,05$).

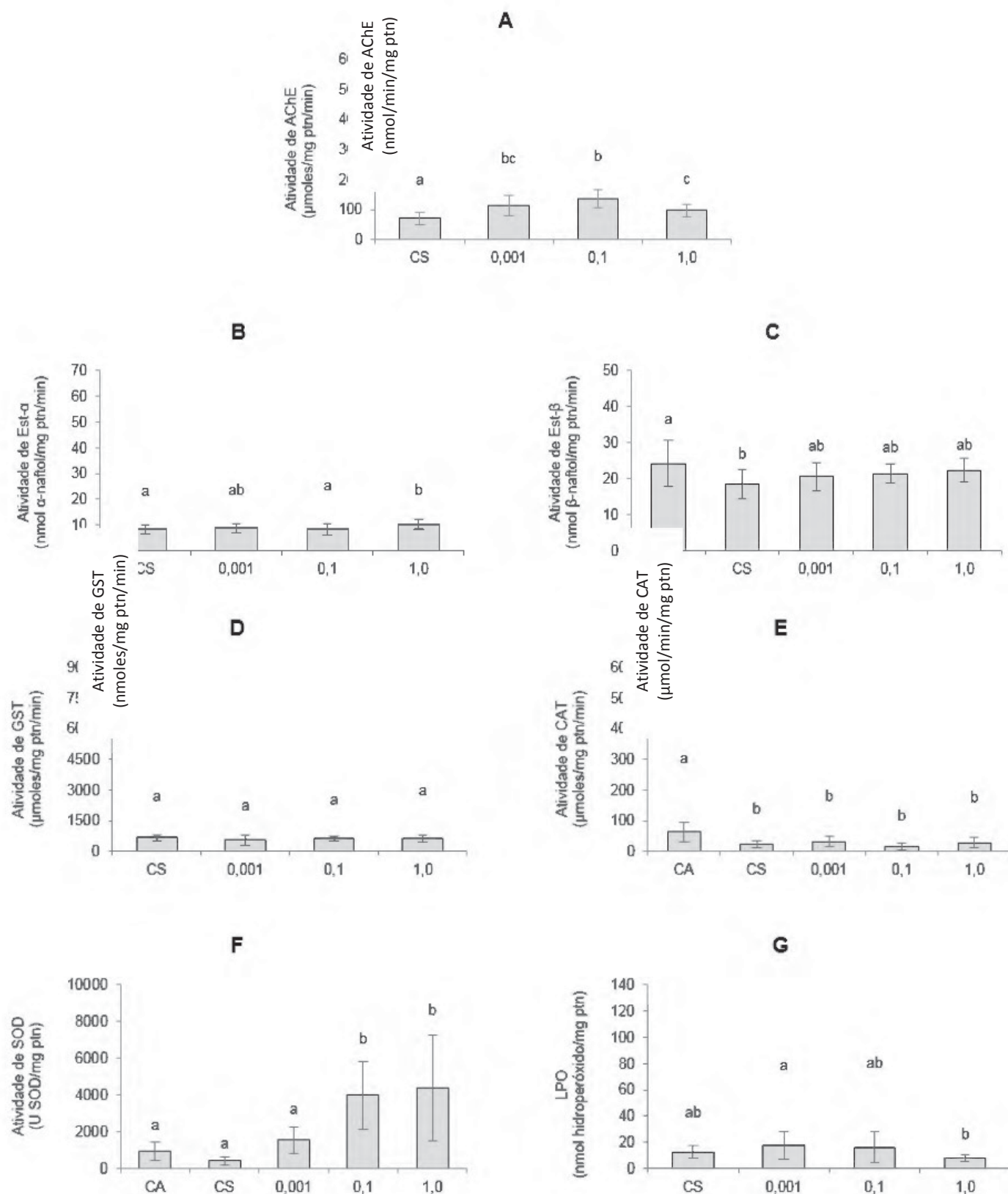


Figura 9. Média e desvio padrão da atividade das enzimas (A) AChE, (B) EST-α, (C) EST-β, (D) GST, (E) CAT, (F) SOD e (G) quantidade de hidropéroxido (LPO) em larvas de campo de *A. aegypti* após exposição subcrônica (5 d) a concentrações nominais de BBP (em mg.L⁻¹) e grupos controles água (CA) e solvente (CS). Letras diferentes indicam alterações significativas (ANOVA com pós-teste de Tukey's; $p < 0,05$).

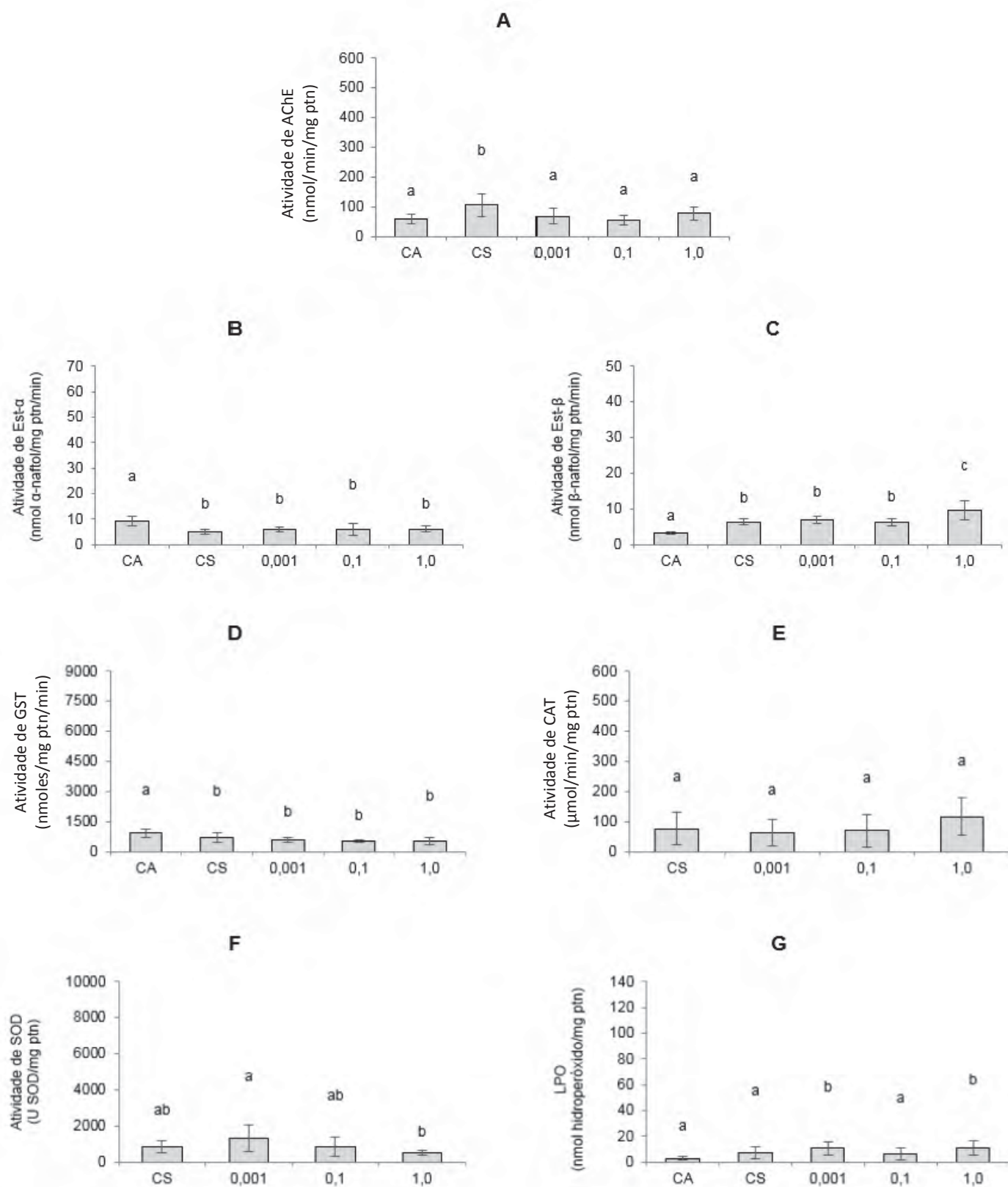


Figura 10. Média e desvio padrão da atividade das enzimas (A) AChE, (B) EST-α, (C) Est-β, (D) GST, (E) CAT, (F) SOD e (G) quantidade de hidróperóxido (LPO) em larvas de laboratório de *A. aegypti* após exposição subcrônica (5 d) a concentrações nominais de BBP (em mg.L⁻¹) e grupos controles água (CA) e solvente (CS). Letras diferentes indicam alterações significativas (ANOVA com pós-teste de Tukey's; p<0,05).

3.4 Parâmetros biológicos

O tamanho das asas de fêmeas da população de campo de *A. aegypti* expostos a BBP foi maior do que o tamanho das asas dos machos. As asas das fêmeas foi significativamente maior na menor concentração ($0,001 \text{ mg.L}^{-1}$) em relação aos controles e demais tratamentos. Em machos não houve diferença significativa entre os tratamentos (Figura 11).

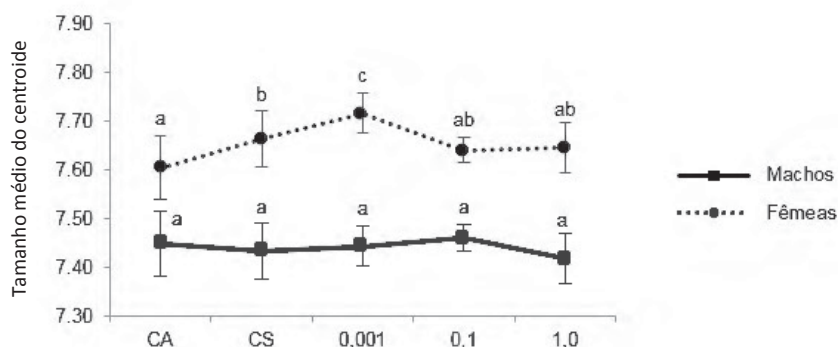


Figura 11. Média do tamanho do centroide das asas direitas de machos e fêmeas de *A. aegypti* da população de campo após exposição crônica a concentrações nominais de BBP (em mg.L^{-1}) e grupos controles água (CA) e solvente (CS). Letras diferentes indicam alterações significativas (ANOVA com pós-teste de Tukey's; $p < 0,05$).

A sobrevivência das larvas indica o percentual médio de larvas no estágio L1 que chegaram ao estágio L4 em exposição subcrônica (cinco dias), e a emergência de adultos indica o percentual médio de larvas no estágio L4 que chegaram ao estágio adulto em exposição crônica (15 dias). Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos em nenhuma das taxas de sobrevivência (Figuras 12A e 12B). As larvas de campo mantidas em exposição à maior concentração de BBP ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$) tiveram maior taxa de emergência de adultos, enquanto na população de laboratório, a maior taxa foi observada na menor concentração ($0,001 \text{ mg.L}^{-1}$) (Figuras 12A e 12B).

O dia de início do estágio de pupa e emergência de machos e fêmeas não apresentou diferença significativa entre os tratamentos em ambas as populações. Na população de campo, as pupas iniciaram primeiramente no controle água e na concentração $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$. Nos grupos controles e na menor concentração ($0,001 \text{ mg.L}^{-1}$) a emergência dos machos ocorreu antes das fêmeas. Nas demais concentrações ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$), a ocorrência média da emergência foi semelhante (Figura 13A). Na população de laboratório, o início das pupas ocorreu entre os dias 5 e 6. Os machos iniciaram a emergência antes das fêmeas nos grupos controles e nos tratamentos,

exceto na concentração 0,1 mg.L⁻¹, tendo início à partir do sétimo dia de exposição (Figura 13B).

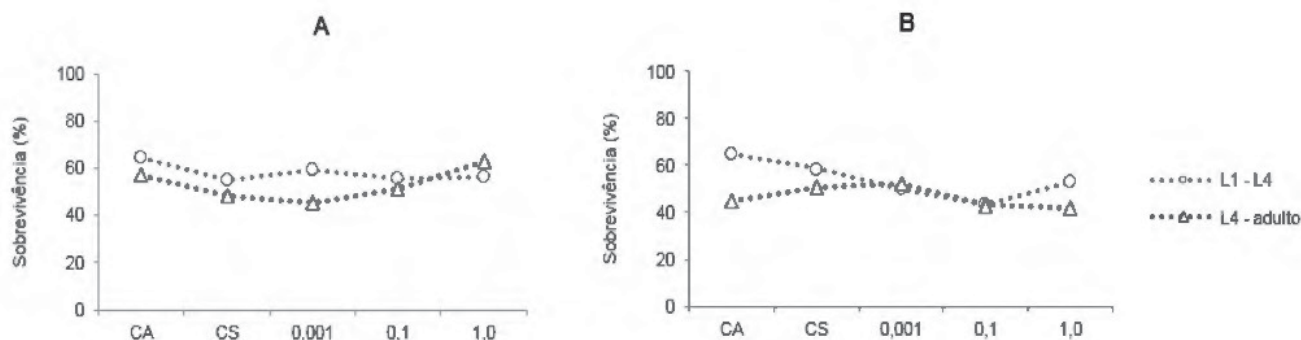


Figura 12. Percentual médio de sobrevivência de larvas e emergência de adultos de *A. aegypti* em exposição a concentrações nominais de BBP (em mg.L⁻¹) e grupos controles água (CA) e solvente (CS). (A) Larvas de campo; (B) Larvas de laboratório; (-○-) Taxa de desenvolvimento de larvas L1 a L4 em exposição subcrônica; (-△-) Taxa de desenvolvimento de larvas L4 a adultos em exposição crônica (ANOVA Kruskal-Wallis com pós-teste de Tukey's; $p < 0,05$).

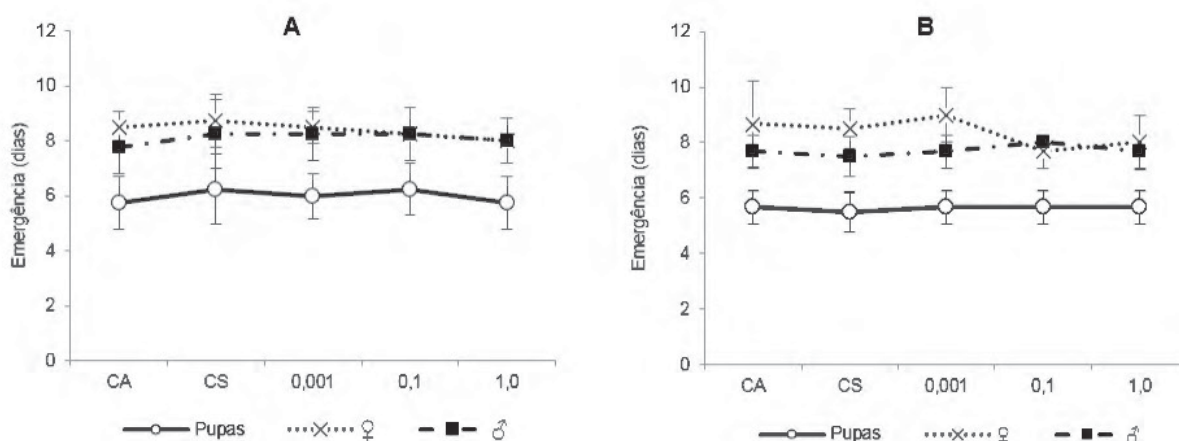


Figura 13. Média e desvio padrão do início da emergência (em dias) de pupas e adultos machos e fêmeas de *A. aegypti* após exposição crônica (15 dias) a concentrações nominais de BBP (em mg.L⁻¹) e grupos controles água (CA) e solvente (CS). (A) Exposição crônica em amostras de campo; (B) Exposição crônica em amostras de laboratório.

O número médio de adultos emergidos por dia das populações de campo (Figura 14A) e de laboratório (Figura 14B) em exposições crônicas variaram entre os tratamentos, porém não tiveram diferenças significativas. Em ambas as populações e todos os tratamentos, a emergência média de adultos foi à partir do sétimo dia de exposição.

Na população de campo, as concentrações 0,1 mg.L⁻¹ e 1,0 mg.L⁻¹ apresentaram pico de emergência no oitavo dia de exposição, controle água no dia 9, controle solvente nos dias 8 e 11, e 0,001 mg.L⁻¹ no dia 11. A emergência de adultos diminuiu à partir do

11º dia em todos os tratamentos, finalizando no 14º dia em CA, CS e 0,1 mg.L⁻¹ e no 15º dia em 0,001 mg.L⁻¹ e 1,0 mg.L⁻¹ (Figura 14A). Na população de laboratório, o grupo controle apresentou o mesmo padrão encontrado na população de campo, com o maior número de emergência ocorrendo nos dias 8 e 11, enquanto o grupo controle água e a concentração 1,0 mg.L⁻¹ apresentaram pico de emergência no 10º dia de exposição, e as concentrações 0,1 mg.L⁻¹ e 0,001 mg.L⁻¹ foram no dia 12. A partir do dia 13 não houve mais emergência de adultos em 0,1 mg.L⁻¹ e nas demais amostras expostas e controles a emergência de adultos finalizou no 14º dia, um dia antes do que a população de campo (Figura 14B).

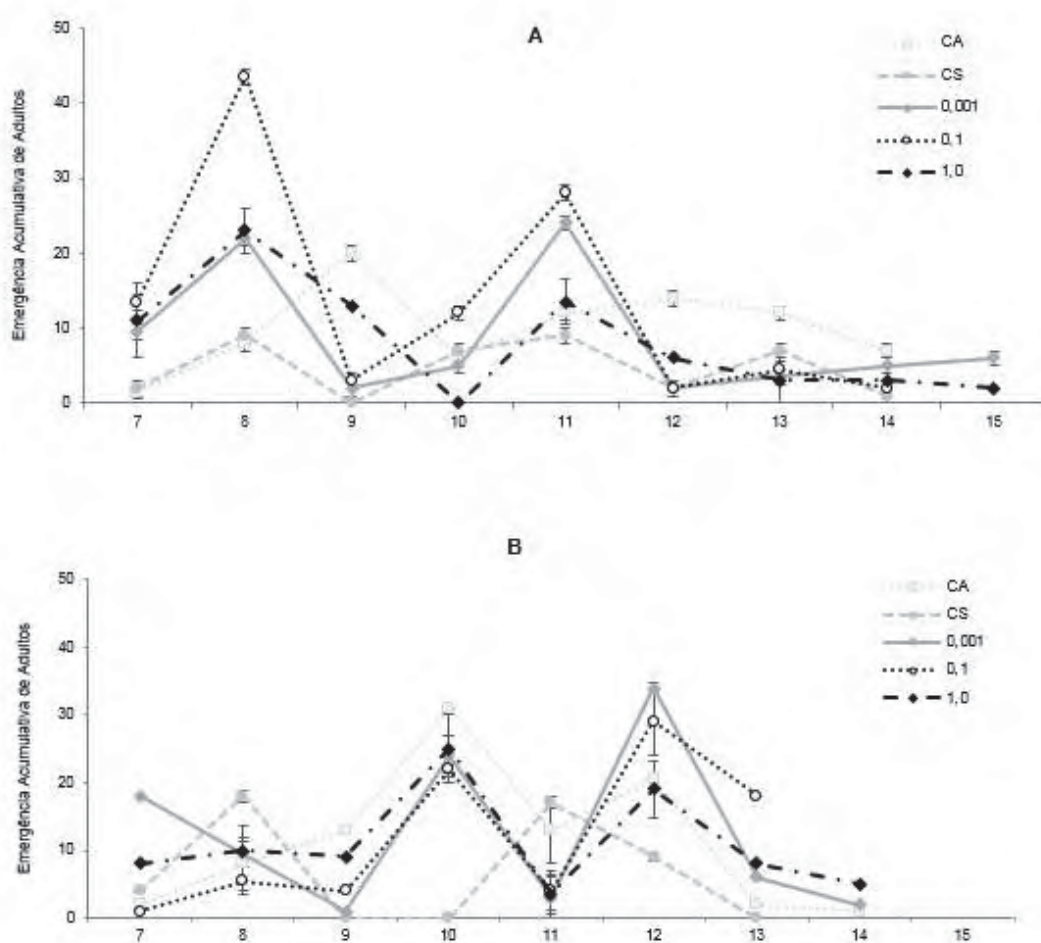


Figura 14. Média e desvio padrão da emergência (em dias) de adultos de *A. aegypti* após exposição crônica (15 dias) a concentrações nominais de BBP (em mg.L⁻¹) e grupos controles água (CA) e solvente (CS). (A) Exposição crônica em amostras de campo; (B) Exposição crônica em amostras de laboratório.

Ao observar a razão sexual na população de campo, nos grupos controles foi verificada maior emergência de machos, e nos tratamentos de fêmeas (Tabela VII). Na população de laboratório, a emergência de machos foi maior em todos os controles e tratamentos, sendo significativos em CA e nas concentrações 0,001 mg.L⁻¹ e 1,0 mg.L⁻¹ (4,7:1 e 4,2:1 respectivamente) (Tabela VII).

Tabela VII. Percentual médio de machos e fêmeas emergidos e razão sexual das populações de campo e de laboratório de *A. aegypti* após exposição crônica (15 dias) a concentrações nominais de BBP (em mg.L⁻¹) e grupos controles água (CA) e solvente (CS). O símbolo (*) indica presença de diferenças significativas e o símbolo (-) indica ausência de diferenças significativas (Qui-quadrado; p<0,05).

	Campo				Laboratório			
	♂	♀	Razão sexual	χ ²	♂	♀	Razão sexual	χ ²
CA	51.4	48.6	1,05:1	*	62.0	38.0	1,6:1	*
CS	62.5	37.5	1,67:1	*	56.3	43.8	1,3:1	-
0,001	47.1	52.9	0,89:1	-	82.4	17.6	4,7:1	*
0,1	48.8	51.3	0,95:1	-	64.9	35.1	1,8:1	-
1,0	46.6	53.4	0,87:1	-	80.7	19.3	4,2:1	*

4 DISCUSSÃO

O presente trabalho traz novas contribuições sobre o modo de ação do BBP em *A. aegypti*, como efeito genotóxico, ação no metabolismo, rotas de detoxificação e respostas ao estresse.

As informações disponíveis sobre a ação dos ftalatos em invertebrados, principalmente em insetos é reduzida, embora tenha sido classificado como tóxico ao meio ambiente pelos órgãos reguladores internacionais e, desta forma, existe a necessidade de compreender os efeitos destas substancias em animais aquáticos ou que possuem parte do seu ciclo de vida em ambiente aquático, inclusive os que apresentam relevância como vetores etiológicos (CUVILLIER-HOT et al., 2014; HERRERO; PLANELLÓ; MORCILLO, 2015; PRUD'HOMME et al., 2017).

A mortalidade das larvas de quarto instar nas populações de campo e laboratório foi verificada na exposição aguda, porém os resultados mostraram que o BBP não apresentou influência na sobrevivência das larvas de *A. aegypti* nas concentrações a que foram submetidos em exposição aguda.

Em *C. riparius*, foram realizados trabalhos de exposição a BBP, também resultando em alta taxa de sobrevivência. Planelló et al. (2011) em 24h de exposição observaram sobrevivência de aproximadamente 75% na concentração 0,01 mg.L⁻¹ e 93% em 0,1 e 1 mg.L⁻¹; Herrero et al. (2014) obtiveram 87% na taxa de sobrevivência em 0,001 mg.L⁻¹, e observaram que as larvas de populações de campo são mais sensíveis que as de cultivo em laboratório. Além disso, verificaram que o DEHP apresenta maior toxicidade comparado ao BBP. Em *C. tentans*, a sobrevivência em exposição de 10 dias a BBP foi de 100% em 1 mg.L⁻¹ (CALL et al., 2001).

Em outros estudos com mosquitos, foram encontrados resultados opostos para outros compostos de ftalatos. Rajamanikyam et al. (2017) verificaram mortalidade dependente da concentração em larvas de *A. aegypti* após 24 horas de exposição aos ftalatos DEHP (0,05 a 0,2 mg.L⁻¹) e DBP (0,001 a 0,02 mg.L⁻¹) e Ganesan et al. (2018) observaram alta taxa de mortalidade em *C. quinquefasciatus* em 24h de exposição a DEHP.

Foram realizadas outras análises a fim de detectar e quantificar danos genéticos, relevantes em estudos ambientais, pois verificam a capacidade que os agentes químicos possuem de induzir mutações nas células somáticas e germinativas e, conseqüentemente, alterar o funcionamento celular (DUA et al., 2013; FRENZILLI et al., 2009).

O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), geradas naturalmente no metabolismo aeróbico, e a capacidade do

organismo de reparar o dano causado ou detoxificá-las (BARREIROS; DAVID, 2006). Os ftalatos perturbam o balanço oxidativo na célula, provocando diversos danos ao organismo, como o aumento da produção de EROs, que podem danificar o DNA degradando-o, reticulando-o, quebrando os filamentos, induzindo cisões, levando a trocas e quebras de cromátides e induzindo a síntese de DNA não-programada (MATHIEU-DENONCOURT et al., 2015). Sendo assim, os resultados obtidos por meio do ensaio cometa alcalino demonstraram que o BBP provocou aumento do dano ao DNA nas populações de campo e laboratório em exposições aguda (48h) e subcrônica (cinco dias), no entanto, a ação foi mais danosa nas larvas provenientes de laboratório do que nas de campo, o que pode indicar possível propriedade genotóxica direta do composto, atestando sua capacidade carcinogênica.

Os danos ao DNA podem interferir na constituição genética da população, ao ocasionarem mutações no material genético (PARK; CHOI, 2007). Sendo assim, o estudo de danos ao DNA relacionado a exposição a contaminantes ambientais podem representar uma importante ferramenta no estudo da toxicidade dos ftalatos.

Trabalhos sobre genotoxicidade em mosquitos e grupos próximos são escassos, porém ambos os trabalhos encontrados demonstraram resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho. Morais (2018), em tese com resultados ainda não publicados, observou a ação genotóxica do BBP sob larvas de *Chironomus sancticarli* Strixino & Strixino, 1981 e Rajamanikyam et al. (2017) observaram citotoxicidade ao avaliar a toxicidade de DEHP e DBP em *A. aegypti* utilizando a técnica de citometria de fluxo.

Para verificar a resposta metabólica do organismo dos mosquitos ao butil benzil ftalato, foram realizados ensaios bioquímicos com as enzimas acetilcolinesterase, esterases α e β , glutationa S-transferase, superóxido dismutase e catalase, e avaliação da peroxidação lipídica (LPO).

A acetilcolinesterase é uma importante enzima biomarcadora de neurotoxicidade, altamente específica do neurotransmissor acetilcolina (ACh), e age removendo-o das fendas sinápticas, regulando a transmissão do impulso nervoso (LANG; YAN ZHU; ZHANG, 2012). Os xenobióticos geralmente provocam a inibição da AChE, que resulta na desregulação da função do sistema nervoso e pode causar efeitos adversos em funções como respiração, alimentação e comportamento, podendo provocar paralisia e morte (CUNHA et al., 2007; PANG et al., 2012).

Os resultados indicaram que, na população de campo, a atividade da enzima AChE aumentou na última concentração em exposição aguda, e em todas as concentrações em exposição subcrônica em relação aos controles. Já a população de laboratório em exposições aguda e subcrônica apresentaram inibição da atividade em relação ao controle solvente. Ou seja, o BBP provocou efeito neurotóxico apenas na

população de laboratório, demonstrando que o composto pode interferir na sobrevivência das larvas de *A. aegypti* criadas em laboratório, enquanto não afeta as larvas de campo. Redução na atividade da AChE também foram obtidas por Moraes (2018), em tese com resultados ainda não publicados, em larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas ao BBP por 48h.

As esterases alfa e beta estão presentes em todos os organismos vivos. Nos insetos, desempenham uma série de funções cruciais no desenvolvimento e no comportamento, como o catabolismo do hormônio juvenil, funções relacionadas a reprodução, digestão e resistência a inseticidas (MONTELLA et al., 2012; PALAKSHA; SHAKUNTHALA, 2015). São consideradas eficientes enzimas da Fase I do metabolismo que se ligam aos poluentes e os transformam em compostos mais instáveis e facilmente excretáveis (CACCIATORE; GUERRERO; COCHÓN, 2013).

De uma forma geral, na população de campo, houve aumento da atividade das esterases em ambos os tempos de exposição, enquanto a população de laboratório demonstrou resultado oposto, com a redução das atividades, com exceção da EST- β em exposição crônica. Sendo assim, os resultados demonstraram reações diferentes nas duas populações, sendo possível observar a indução dos processos de fase I apenas na população proveniente do campo. Na população de laboratório, a inibição das reações de desintoxicação pode ter levado a uma diminuição da capacidade de metabolização das larvas.

A glutathione S-transferase (GST) pertence a uma família de enzimas envolvidas na biotransformação e detoxificação celular de um grande número de compostos endógenos e exógenos, sendo capaz de detectá-los à partir da medida de sua indução (ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005). Está ligada ao sistema de proteção contra o estresse oxidativo e participam do metabolismo de Fase II, catalisando a conjugação das glutathionas com substratos hidrofóbicos, gerando produtos menos reativos e mais solúveis em água, e assim, mais facilmente excretados das células (SHI et al., 2012; SRIKANTH et al., 2013). Também possui função antioxidante, reduzindo a peroxidação lipídica e detoxificando os produtos finais deste processo (SINGHAL et al., 2015). Sendo assim, a inibição na atividade da GST pode diminuir a habilidade de combater os danos de LPO (CUNHA et al., 2007; MELA et al., 2014).

Nos ensaios agudos, em ambas as populações, houve aumento da atividade da enzima GST, sendo a maior atividade encontrada na concentração mais alta. Nos ensaios subcrônicos, a atividade manteve-se inalterada nas populações de campo e diminuiu nas populações de laboratório. Ou seja, a enzima teve comportamento antagônico nos diferentes tempos de exposição. Em exposição aguda foi observada a atuação da enzima no processo de metabolismo de Fase II, porém com maior tempo de

exposição, não houve a participação da GST na detoxificação do BBP. Esta redução na atividade possivelmente ocorre como um mecanismo de tolerância ao dano celular, diminuindo a síntese de proteínas até que haja o fim do dano, sendo condizente com os resultados de baixa taxa de mortalidade (HERRERO; PLANELLÓ; MORCILLO, 2015).

Herrero et al. (2014; 2015), ao expor larvas de *C. riparius* ao BBP por 48h também encontraram inibição na atividade da GST e repressão dos genes ligados à detoxificação ao aumentar a concentração do contaminante. Além disso, os níveis de atividade das GSTs podem variar de acordo com os estágios de vida do inseto. Enayati et al. (2005) citam em seu trabalho que, em *A. aegypti*, a atividade total da GST medida com CDNB e GSH cresceu durante o desenvolvimento larval, porém, nosso resultado para a exposição crônica não foi o mesmo, sugerindo que o BBP pode ter afetado o comportamento da GST.

Em conjunto, os resultados dos ensaios agudos de campo indicam que o BBP é capaz de atuar significativamente nas respostas de desintoxicação de fase I, enquanto afetam as enzimas de fase II, pois o comportamento das enzimas de ambas as fases estão diretamente ligados. Ao entrar em contato com o BBP ocorreu ativação das enzimas metabólicas de fase I, resultando na aceleração da transformação de BBP em seus metabólitos. Entretanto, em exposição crônica, a repressão da atividade da GST provavelmente fez com que houvesse um acúmulo dos metabólitos de fase I nos tecidos. Devido ao aumento dos substratos para as enzimas de fase II, a velocidade com que os metabólitos foram convertidos foram melhorando gradualmente, atingindo o equilíbrio entre a formação de metabólitos, a metabolização e a excreção (LIU et al., 2014).

Em teoria, a população de laboratório é mais sensível às diferentes substâncias tóxicas a que são submetidas, pois graças à ausência de pressão de seleção e à endogamia, o seu patrimônio genético responde mais fracamente aos processos de detoxificação. Já na população de campo a resposta das enzimas de biotransformação ocorreu possivelmente devido à ativação anterior dos processos de metabolização pela exposição a diferentes componentes estressores em ambiente natural.

A SOD representa a primeira via de defesa antioxidante dos organismos e atuam capturando os radicais superóxidos, a fim de evitar a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). A SOD dismuta superóxido em O_2 e H_2O_2 , que posteriormente pode ser transformado em O_2 e H_2O pela CAT (MATHIEU-DENONCOURT et al., 2015). Consequentemente, a CAT também faz parte do metabolismo de defesa antioxidante das células, contribuindo para evitar o estresse oxidativo (NICHOLLS, 2012). O radical superóxido está envolvido em diversos efeitos deletérios nas células como a

peroxidação lipídica e danos ao DNA (MATHIEU-DENONCOURT et al., 2015). Sendo assim, SOD, CAT, LPO e danos ao DNA estão funcionalmente relacionados.

Neste trabalho, o BBP parece provocar alterações na via de defesa antioxidante. Porém, o resultado esperado seria uma resposta similar para ambas as enzimas, já que CAT e SOD estão relacionadas. No entanto, ocorreu o mesmo padrão apenas na população de laboratório em exposição subcrônica, na qual não foi possível evidenciar alterações nas atividades das enzimas em relação aos controles.

A peroxidação lipídica (LPO) está envolvida com a mobilização de lipídios e a maturação celular e tem sido utilizada para avaliar o estresse oxidativo provocado por xenobióticos (BARREIROS; DAVID, 2006; VALAVANIDIS et al., 2006). Os resultados obtidos mostraram aumento da peroxidação lipídica na população de laboratório em exposição aguda e em ambas as exposições na população de campo, sugerindo que a exposição ao BBP pode ocasionar inatividade funcional e estrutural da membrana celular, podendo chegar a elevados níveis de alterações teciduais (QU et al., 2014).

Além disso, os dados obtidos para LPO tiveram relação inversamente proporcional aos resultados de GST para as larvas de laboratório em ambas as exposições, agindo conforme o esperado, já que a inibição na atividade da GST pode diminuir a habilidade de combater a peroxidação lipídica (MELA et al., 2014).

A morfologia de insetos recebe influências tanto genéticas quanto ambientais e as variações nas características morfométricas relacionadas a tamanho e forma podem fornecer informações relevantes sobre os vários aspectos biológicos (JIRAKANJANAKIT et al., 2007b). Diversos trabalhos foram realizados indicando que o comprimento da asa está relacionada ao tamanho do corpo e à fecundidade em mosquitos, incluindo o gênero *Aedes* (PACKER; CORBET, 1989; BRIEGEL, 1990; BLACKMORE; LORD, 2000; ARMBRUSTER; HUTCHINSON, 2002; MORI et al., 2008; LEISNHAM et al., 2009; MCCANN et al., 2009), sendo assim, a análise do tamanho da asa pode ser utilizada como um biomarcador de estresse ambiental na investigação da alteração de caracteres morfológicos.

Os resultados obtidos para o tamanho do centroide em machos da população de campo não tiveram diferenças significativas entre os tratamentos. Em geral, o tamanho das asas das fêmeas foi maior do que o tamanho das asas dos machos. Nas fêmeas, pudemos observar que a menor concentração ($0,001 \text{ mg.L}^{-1}$) provocou alteração no tamanho das asas, sendo maior em relação aos demais tratamentos e controles. No ambiente natural, o isolamento físico é esperado para populações de *A. aegypti*, e o aumento do tamanho das asas das fêmeas pode refletir no aumento do tamanho corporal, maior quantidade de oviposição de ovos (STRICKMAN; KITTAYAPONG,

2003) e maiores capacidades vetorial e de dispersão (JIRAKANJANAKIT et al., 2007a; LORENZ et al., 2014).

Embora o tamanho de uma espécie de mosquito tenha base genética, os fatores ambientais, como temperatura, nutrição, densidade larval, salinidade e exposição a contaminantes também afetam o desenvolvimento, e consequentemente, o tamanho dos indivíduos adultos (CLEMENTS, 1992). Quando alguns animais são submetidos a estresses ambientais, mostram níveis aumentados de assimetria em seu formato e tamanho corporal (HODKINSON; JACKSON, 2005).

O dimorfismo sexual utilizando o tamanho do centroide foi verificado em trabalhos com culicídeos, sendo as asas das fêmeas maiores que a dos machos, mesmo sob condições de criação similares e sem exposição a estresse ambiental (CARRON, 2007; DEVICARI; LOPES; SUESDEK, 2011; DHIVYA; MANIMEGALAI, 2013; VIDAL et al., 2012), refletindo no maior tamanho corporal das fêmeas em relação aos machos (SIMOY et al, 2015). Prud'homme et al. (2017), em trabalho com *A. aegypti*, verificaram que o plastificante bisfenol-A ($0,4 \mu\text{g.L}^{-1}$) afetou o desenvolvimento dos machos, induzindo aumento do tamanho das asas, e consequentemente, aumento do tamanho do corpo, porém sem ocasionar consequências na progênie.

Estudos com *C. riparius* em exposição a cinco concentrações de BBP por 24h verificaram mudanças na expressão de genes que codificam proteínas relacionadas ao sistema endócrino e relacionadas ao desenvolvimento e reprodução (PLANELLÓ et al., 2011). Sendo assim, os parâmetros biológicos podem ser uma forma de avaliação deste comportamento do feto em insetos (HERRERO et al., 2015; SIBLEY et al., 1997).

Os resultados obtidos na análise dos parâmetros biológicos demonstraram efeito positivo da exposição crônica ao BBP, tendo implicações diretas na transmissão de agente etiológicos pelo *A. aegypti*, pois segundo Couret e Benedict (2014), as características da história de vida e do desenvolvimento são de importância epidemiológica para a dinâmica de doenças arbovirais, associadas a aspectos críticos da capacidade vetorial, como alterações nas taxas de transmissão, infecção e disseminação de vírus.

Experimentos realizados para determinar a taxa de desenvolvimento de mosquitos do gênero *Aedes*, em ambiente tropical, verificaram que os estágios imaturos duram de 6 a 8 dias até a emergência do adulto (CDC, 2012). Zeller e Koella (2016) verificaram que em condições de alto fornecimento de alimento, os mosquitos levavam 10 dias para atingir o estágio adulto; e Wang et al. (2011a) verificaram que a alteração na duração do tempo de vida do organismo reflete mudanças no tempo necessário para atingir a maturidade sexual e o tempo de desenvolvimento de um óvulo.

Em espécies do gênero *Aedes* normalmente ocorre a protandria, caracterizada pela emergência dos machos antes das fêmeas. O desenvolvimento mais rápido dos machos serve para obter acesso às fêmeas virgens, porém tem como consequência o menor tamanho. Já as fêmeas têm o desenvolvimento mais demorado para atingir maior tamanho corporal, atribuído positivamente à fecundidade ao longo da vida (BEDHOMME et al., 2003). Diante disso, pudemos observar nos resultados obtidos para população de laboratório que somente em exposição à concentração $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ os machos emergiram depois das fêmeas, e consequentemente, nesta concentração foram encontrados machos com o maior tamanho das asas, embora as diferenças não tenham sido significativas.

Em geral, as diferentes respostas obtidas entre as populações de campo e de laboratório ocorreram porque as populações provenientes da natureza possivelmente entraram em contato previamente com estes e outros compostos tóxicos, tendo seus sistemas metabólicos adaptados às condições físico-químicas do nicho ecológico em que habitam (HERRERO et al., 2014). Além disso, as populações naturais não são geneticamente homogêneas como as populações criadas em laboratório, e muitos fatores são passíveis de afetar o desenvolvimento do inseto (JIRAKANJANAKIT; DUJARDIN, 2005; JIRAKANJANAKIT et al., 2008). Kuno (2010) mapeou a origem das populações de *A. aegypti* mantidas em laboratórios do mundo todo, e concluímos que a cepa Rockefeller, criada em nosso laboratório e utilizada no trabalho atual, é anterior a 1950. Portanto, como destacado por Powell e Evans (2017), em populações de *A. aegypti* criadas há muitos anos em laboratório ocorre a endogamia e, consequentemente, redução da heterozigosidade.

Koenraadt et al. (2010) compararam populações de *A. aegypti* de campo e de laboratório e verificaram que a população endogâmica demonstrou menor sobrevivência e maior tempo de desenvolvimento do que a de campo. Os mesmos autores relataram maiores custos de *fitness* provocados pela endogamia em relação a população silvestre. Ross et al (2017) realizaram uma investigação comparando linhagens isogênicas e endogâmicas de *A. aegypti* derivadas da mesma população e verificaram que na população de laboratório o desenvolvimento foi mais rápido e os mosquitos emergidos eram menores do que na população ancestral. Período de desenvolvimento mais curtos também foi observado no presente trabalho, sugerindo que esta diferença não tenha ocorrido devido à exposição ao BBP.

A aceleração do desenvolvimento em *A. aegypti*, como ocorreu com a concentração intermediária em ambas as populações, pode estar associada ao valor adaptativo e ao aumento na taxa de crescimento populacional (MARTINS et al., 2012; PEREZ; NORIEGA, 2012). A redução na mortalidade durante o desenvolvimento, ou o

fato de não haver diferença entre as amostras expostas e o controle em ambas as populações e tempos de exposição, podem resultar em consequências positivas para a população, aumentando a taxa de recrutamento (PRUD'HOMME et al., 2017). Como constatado por Simoy et al. (2015), a sobrevivência de larvas e pupas em *A. aegypti* são fatores importantes que influenciam a dinâmica populacional.

Para relacionar os efeitos da exposição dos indivíduos a um contaminante específico a níveis mais elevados de organização biológica, as respostas dos biomarcadores devem estar relacionadas em um grau de comprometimento do crescimento, da produção reprodutiva ou da função metabólica que afeta diretamente a sobrevivência do organismo (CHOI, 2005), assim como foi possível observar no presente trabalho.

Sendo assim, podemos inferir que o BBP pode provocar alterações no desenvolvimento de *Aedes aegypti* em diversos níveis de organização biológica, desde a escala celular à populacional. Por se tratar de um mosquito vetor de agentes etiológicos de doenças que provocam inúmeras mortes e consequências à saúde pública, alterações ligeiramente positivas podem favorecer a dinâmica populacional e a capacidade vetorial. Além disso, a presença de poluentes pode prejudicar a eficácia de inseticidas químicos e biológicos a longo prazo (PRUD'HOMME et al., 2017).

5 CONCLUSÃO

O estudo demonstrou que as exposições aguda, subcrônica e crônica ao BBP provocaram efeitos tanto negativos quanto positivos sobre as larvas de *Aedes aegypti*. Foram encontradas alterações nas vias metabólicas associadas à regulação do sistema nervoso e danos no DNA, indicando seu potencial neurotóxico e genotóxico. Resultados mais prejudiciais foram observados na população de campo em comparação à população de laboratório, com destaque para os biomarcadores bioquímicos de neurotoxicidade, de biotransformação e de defesa ao estresse oxidativo.

A ação do BBP provocou maiores danos ao DNA nas larvas provenientes de laboratório do que nas de campo, o que pode indicar uma possível propriedade genotóxica direta do composto, atestando sua capacidade carcinogênica.

A exposição ao BBP favoreceu questões reprodutivas e de desenvolvimento em exposição crônica, com a redução da mortalidade durante o desenvolvimento, aumento no tamanho das asas das fêmeas e redução do ciclo de vida, fatores que podem alterar a dinâmica populacional e a capacidade vetorial da espécie, e consequentemente, levar a implicações na transmissão de agente etiológicos pelo *A. aegypti*. Portanto, o ftalato BBP não deve ser utilizado em ações de controle de *A. aegypti*.

REFERÊNCIAS

- ABDEL DAIEM, M. M.; RIVERA-UTRILLA, J.; OCAMPO-PÉREZ, R.; MÉNDEZ-DÍAZ, J. D.; SÁNCHEZ-POLO, M. Environmental impact of phthalic acid esters and their removal from water and sediments by different technologies - A review. **Journal of Environmental Management**, v. 109, n. 1, p. 164–178, 2012. DOI. 10.1016/j.jenvman.2012.05.014.
- ARMBRUSTER, P.; HUTCHINSON, R. A. Pupal Mass and Wing Length as Indicators of Fecundity in *Aedes albopictus* and *Aedes geniculatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 39, n. 4, p. 699–704, 2002. DOI. 10.1603/0022-2585-39.4.699.
- AZQUETA, A.; GUTZKOW, K. B.; BRUNBORG, G.; COLLINS, A. R. Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 724, n. 1–2, p. 41–45, 2011a. DOI. 10.1016/j.mrgentox.2011.05.010.
- AZQUETA, A.; MEIER, S.; PRIESTLEY, C.; GUTZKOW, K. B.; BRUNBORG, G.; COLLINS, A. The influence of scoring method on variability in results obtained with the comet assay. **Mutagenesis**, v. 26, n. 3, p. 393–399, 2011b. DOI. 10.1093/mutage/geq105.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006. DOI. 10.1590/S0100-40422006000100021.
- BEDHOMME, S.; AGNEW, P.; SIDOBRE, C.; MICHALAKIS, Y. Sex-specific reaction norms to intraspecific larval competition in the mosquito *Aedes aegypti*. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 16, n. 4, p. 721–730, 2003. DOI. 10.1046/j.1420-9101.2003.00576.x.
- BLACKMORE, M. S.; LORD, C. C. The relationship between size and fecundity in *Aedes albopictus*. **Journal of Vector Ecology**, v. 25, n. 2, p. 212–217, dez. 2000.
- BONO-BLAY, F.; GUART, A.; FUENTE, B.; PEDEMONTE, M.; PASTOR, M. C.; BORRELL, A.; LACORTE, S. Survey of phthalates, alkylphenols, bisphenol A and herbicides in Spanish source waters intended for bottling. **Environmental science and pollution research international**, v. 19, n. 8, p. 3339–3349, set. 2012. DOI. 10.1007/s11356-012-0851-y.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248–254, maio 1976. DOI. 10.1006/abio.1976.9999.
- BRIEGEL, H. Metabolic relationship between female body size, reserves, and fecundity of *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**, v. 36, n. 3, p. 165–172, jan. 1990. DOI. 10.1016/0022-1910(90)90118-Y.
- CACCIATORE, L. C.; GUERRERO, N. V.; COCHÓN, A. C. Cholinesterase and carboxylesterase inhibition in *Planorbarius corneus* exposed to binary mixtures of azinphos-methyl and chlorpyrifos. **Aquatic Toxicology**, v. 128–129, n. 1, p. 124–134, mar. 2013. DOI. 10.1016/j.aquatox.2012.12.005.
- CALL, D. J.; MARKEE, T. P.; GEIGER, D. L.; BROOKE, L. T.; VANDEVENTER, F. A.; COX, D. A.; GENISOT, K. I.; ROBILLARD, K. A.; GORSUCH, J. W.; PARKERTON, T.

F.; REILEY, M. C.; ANKLEY, G. T.; MOUNT, D. R. An assessment of the toxicity of phthalate esters to freshwater benthos. 1. Aqueous exposures. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, n. 8, p. 1798–1804, 2001. DOI. 10.1002/etc.5620200826.

CARRON, A. Correlation between wing measurements and dry body weight in male and female *Ochlerotatus (Ochlerotatus) caspius* (Pallas, 1771) (Diptera: Culicidae). **European Mosquito Bulletin**, v. 24, n. 1, p. 4–8, 2007.

CHOI, J. Ecotoxicological Biomonitoring at Different Levels of Biological Organization and Its Application in *Chironomus spp.* **Journal of Environmental Toxicology**, v. 20, n. 1, p. 1–11, 2005.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008. DOI. 10.1590/s0100-40422008000700038.

COURET, J.; BENEDICT, M. Q. A meta-analysis of the factors influencing development rate variation in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **BMC Ecology**, v. 14, n. 3, p. 1–15, jan. 2014. DOI. 10.1186/1472-6785-14-3.

CUNHA, I.; MANGAS-RAMIREZ, E.; GUILHERMINO, L. Effects of copper and cadmium on cholinesterase and glutathione S-transferase activities of two marine gastropods (*Monodonta lineata* and *Nucella lapillus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 145, n. 4, p. 648–657, 2007. DOI. 10.1016/j.cbpc.2007.02.014.

CUVILLIER-HOT, V.; SALIN, K.; DEVERS, S.; TASIEMSKI, A.; SCHAFFNER, P.; BOULAY, R.; BILLIARD, S.; LENOIR, A. Impact of ecological doses of the most widespread phthalate on a terrestrial species, the ant *Lasius niger*. **Environmental research**, v. 131, n. 1, p. 104–110, maio 2014. DOI. 10.1016/j.envres.2014.03.016.

DEVICARI, M.; LOPES, A. R.; SUESDEK, L. Dimorfismo sexual alar em *Aedes scapularis* (Diptera: Culicidae). **Biota Neotropica**, v. 11, n. 2, p. 1–5, 2011. DOI. 10.1590/s1676-06032011000200016.

DHIVYA, R.; MANIMEGALAI, K. Wing Shape Analysis of the *Japanese encephalitis* vector *Culex gelidus* (Diptera: Culicidae) at the Foot Hill of Southern Western Ghats, India. **World Journal of Zoology**, v. 8, n. 1, p. 119–125, 2013. DOI. 10.5829/idosi.wjz.2013.8.1.7277.

DIZER, H.; SILVA-DE-ASSIS, H. C.; HANSEN, P. D. Cholinesterase activity as a bioindicator for monitoring marine pollution in the Baltic Sea and the Mediterranean Sea. In: **Biomarkers in Marine Organisms: a practical approach**. p. 331–342.

DUA, V. K.; KUMAR, A.; PANDEY, A. C.; KUMAR, S. Insecticidal and genotoxic activity of *Psoralea corylifolia* Linn. (Fabaceae) against *Culex quinquefasciatus* Say, 1823. **Parasites & vectors**, v. 6, n. 1, p. 30, jan. 2013. DOI. 10.1186/1756-3305-6-30.

ECHA. **Candidate List of substances of very high concern for Authorisation**Helsinki, FinlandEuropean Chemicals Agency, 2016.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES JR, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 1, p. 88–95, 1961. DOI. 10.1016/0006-2952(61)90145-9.

ENAYATI, A. A.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. **Insect Molecular Biology**, v. 14, n. 1, p. 3–8, jan. 2005. DOI. 10.1111/j.1365-2583.2004.00529.x.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. 1. ed. São Paulo: EDUSP, 1996.

FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; LYONS, B. P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutation Research**, v. 681, n. 1, p. 80–92, 2009. DOI. 10.1016/j.mrrev.2008.03.001.

GANESAN, P.; STALIN, A.; GABRIEL PAULRAJ, M.; BALAKRISHNA, K.; IGNACIMUTHU, S.; ABDULLAH AL-DHABI, N. Biocontrol and non-target effect of fractions and compound isolated from *Streptomyces rimosus* on the immature stages of filarial vector *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) and the compound interaction with Acetylcholinesterase. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 161, n. 1, p. 120–128, 2018. DOI. 10.1016/j.ecoenv.2018.05.061.

GAO, R.; YUAN, Z.; ZHAO, Z.; GAO, X. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 45, n. 1, p. 41–45, 1998. DOI. 10.1016/S0302-4598(98)00072-5.

GEYER, R.; JAMBECK, J. R.; LAW, K. L. Production, use, and fate of all plastics ever made. **Science Advances**, v. 3, n. e1700782, p. 1–5, 2017. DOI. 10.1126/sciadv.1700782.

GOMES, A. D. C. Medidas dos níveis de infestação urbana para *Aedes (Stegomyia) aegypti* e *Aedes (stegomyia) albopictus* em Programa de Vigilância Entomológica. **Informe Epidemiológico do Sus (IESUS)**, v. 7, n. 3, p. 49–57, set. 1998. DOI. 10.5123/S0104-16731998000300006.

GOMES, A. dos S.; SCIAVICO, C. J. de S.; EIRAS, Á. E. Periodicidade de oviposição de fêmeas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) em laboratório e campo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 4, p. 327–332, 2006. DOI. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822006000400002>.

HALDEN, R. U. Plastics and Health Risks. **Annual Review of Public Health**, v. 31, n. 1, p. 179–194, 2010. DOI. 10.1055/s-2004-832376.

HEMINGWAY, J. (ed.). **Techniques to detect insecticide resistance mechanisms (field and laboratory manual)**. World Health Organization, 1998. v. 6

HERRERO, Ó.; PLANELLÓ, R.; AQUILINO, M.; MORCILLO, G. Evaluación de los efectos tóxicos de ftalatos sobre poblaciones naturales de *Chironomus riparius* (Diptera): implicaciones en estudios de ecotoxicidad. **Revista de Toxicología**, v. 31, n. 2, p. 176–186, 2014.

HERRERO, Ó.; PLANELLÓ, R.; MORCILLO, G. The plasticizer benzyl butyl phthalate (BBP) alters the ecdysone hormone pathway, the cellular response to stress, the energy metabolism, and several detoxication mechanisms in *Chironomus riparius* larvae. **Chemosphere**, v. 128, n. 1, p. 266–77, jun. 2015. DOI. 10.1016/j.chemosphere.2015.01.059.

HODKINSON, I. D.; JACKSON, J. K. Terrestrial and Aquatic Invertebrates as Bioindicators for Environmental Monitoring, with Particular Reference to Mountain Ecosystems. **Environmental Management**, v. 35, n. 5, p. 649–666, 2005. DOI. 10.1007/s00267-004-0211-x.

HUBINGER, J. C. A survey of phthalate esters in consumer cosmetic products. **Journal of Cosmetic Science**, v. 61, n. 1, p. 457–465, 2010.

HUGO AEBI. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. 1947, p. 121–126, 1984. DOI. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).

IARC. **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**. Lyon, France, 2014.

INMETRO. **Portaria n. 563, de 29 de dezembro de 2016**, 2016.

JIANG, Z.-Y.; HUNT, J. V.; WOLFF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, v. 202, n. 2, p. 384–389, 1992. DOI. 10.1016/0003-2697(92)90122-n.

JIRAKANJANAKIT, N.; DUJARDIN, J. P. Discrimination of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) laboratory lines based on wing geometry. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 36, n. 4, p. 858–861, 2005.

JIRAKANJANAKIT, N.; LEEMINGSAWAT, S.; DUJARDIN, J. P. The geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti* in isofemale lines through successive generations. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, n. 4, p. 414–421, jul. 2008. DOI. 10.1016/j.meegid.2007.05.004.

JIRAKANJANAKIT, N.; LEEMINGSAWAT, S.; THONGRUNGIAT, S.; APIWATHNASORN, C.; SINGHANIYOM, S.; BELLEC, C.; DUJARDIN, J. P. Influence of larval density or food variation on the geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti*. **Tropical Medicine and International Health**, v. 12, n. 11, p. 1354–1360, 2007a. DOI. 10.1111/j.1365-3156.2007.01919.x.

JIRAKANJANAKIT, N.; LEEMINGSAWAT, S.; THONGRUNGIAT, S.; APIWATHNASORN, C.; SINGHANIYOM, S.; BELLEC, C.; DUJARDIN, J. P. Influence of larval density or food variation on the geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti*. **Tropical Medicine and International Health**, v. 12, n. 11, p. 1354–1360, nov. 2007b. DOI. 10.1111/j.1365-3156.2007.01919.x.

KOENRAADT, C. J. M.; KORMAKSSON, M.; HARRINGTON, L. C. Effects of inbreeding and genetic modification on *Aedes aegypti* larval competition and adult energy reserves. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 92, p. 1–11, 2010. DOI. 10.1186/1756-3305-3-92.

KOPPEN, G.; AZQUETA, A.; POURRUT, B.; BRUNBORG, G.; COLLINS, A. R.; LANGIE, S. A. S. The next three decades of the comet assay: a report of the 11th International Comet Assay Workshop. **Mutagenesis**, v. 32, n. 1, p. 397–408, 2017. DOI. 10.1093/mutage/gex002.

KUNO, G. Early History of Laboratory Breeding of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Focusing on the Origins and Use of Selected Strains. **Journal of Medical Entomology**, v. 47, n. 6, p. 957–971, 2010. DOI. 10.1603/ME10152.

LANG, G.-J.; YAN ZHU, K.; ZHANG, C.-X. Can Acetylcholinesterase Serve as a Target for Developing More Selective Insecticides? **Current Drug Targets**, v. 13, n. 4, p. 495–501, abr. 2012. DOI. 10.2174/138945012799499712.

LEE, S.-B.; CHOI, J. Multilevel evaluation of nonylphenol toxicity in fourth-instar larvae of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 11, p. 3006–3014, 2006. DOI. 10.1897/05-601r1.1.

LEISNHAM, P. T.; LOUNIBOS, L. P.; O'MEARA, G. F.; JULIANO, S. A. Interpopulation divergence in competitive interactions of the mosquito *Aedes albopictus*. **Ecology**, v. 90, n. 9, p. 2405–2413, 2009. DOI. 10.1890/08-1569.1.

LENOIR, A.; CUVILLIER-HOT, V.; DEVERS, S.; CHRISTIDÈS, J.-P.; MONTIGNY, F. Ant cuticles: a trap for atmospheric phthalate contaminants. **The Science of the Total Environment**, v. 441, n. 1, p. 209–212, dez. 2012. DOI.

10.1016/j.scitotenv.2012.10.003.

LENOIR, A.; TOUCHARD, A.; DEVERS, S.; CHRISTIDÈS, J.-P.; BOULAY, R.; CUVILLIER-HOT, V. Ant cuticular response to phthalate pollution. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 1, p. 13446–13451, dez. 2014. DOI. 10.1007/s11356-014-3272-2.

LERTSIRISOPON, R.; SODA, S.; SEI, K.; IKE, M. Abiotic degradation of four phthalic acid esters in aqueous phase under natural sunlight irradiation. **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, n. 3, p. 285–290, 2009. DOI. 10.1016/S1001-0742(08)62265-2.

LIANG, D.-W.; ZHANG, T.; FANG, H. H. P.; HE, J. Phthalates biodegradation in the environment. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 80, n. 2, p. 183–198, ago. 2008. DOI. 10.1007/s00253-008-1548-5.

LIU, D.; PAN, L.; LI, Z.; CAI, Y.; MIAO, J. Metabolites analysis, metabolic enzyme activities and bioaccumulation in the clam *Ruditapes philippinarum* exposed to benzo[a]pyrene. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 107, n. 1, p. 251–259, 2014. DOI. 10.1016/j.ecoenv.2014.06.024.

LORENZ, C.; MARQUES, T. C.; SALLUM, M. A. M.; SUESDEK, L. Altitudinal population structure and microevolution of the malaria vector *Anopheles cruzii* (Diptera: Culicidae). **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 581, p. 1–12, 2014. DOI. 10.1186/s13071-014-0581-8.

MARTINE, B.; MARIE-JEANNE, T.; CENDRINE, D.; FABRICE, A.; MARC, C. Assessment of adult human exposure to phthalate esters in the urban centre of Paris (France). **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 90, n. 1, p. 91–96, jan. 2013. DOI. 10.1007/s00128-012-0859-5.

MARTINS, A. J.; RIBEIRO, C. D. E. M.; BELLINATO, D. F.; PEIXOTO, A. A.; VALLE, D.; LIMA, J. B. P. Effect of insecticide resistance on development, longevity and reproduction of field or laboratory selected *Aedes aegypti* populations. **PloS one**, v. 7, n. 3, p. e31889, jan. 2012. DOI. 10.1371/journal.pone.0031889.

MATHIEU-DENONCOURT, J.; WALLACE, S. J.; DE SOLLA, S. R.; LANGLOIS, V. S. Plasticizer endocrine disruption: Highlighting developmental and reproductive effects in mammals and non-mammalian aquatic species. **General and Comparative Endocrinology**, v. 219, n. 1, p. 74–88, 2015. DOI. 10.1016/j.ygcen.2014.11.003.

MCCANN, S.; DAY, J. F.; ALLAN, S.; LORD, C. C. Age modifies the effect of body size on fecundity in *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Journal of Vector Ecology**, v. 34, n. 2, p. 174–181, 2009. DOI. 10.1111/j.1948-7134.2009.00024.x.

MELA, M.; FILIPAK-NETO, F.; YAMAMOTO, F. Y.; ALMEIDA, R.; GROTZNER, S. R.; VENTURA, D. F.; RIBEIRO, C. A. de O.; NETO, F. F.; YAMAMOTO, F. Y.; ALMEIDA, R.; GRÖTZNER, S. R.; VENTURA, D. F.; DE OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Mercury distribution in target organs and biochemical responses after subchronic and trophic exposure to Neotropical fish *Hoplias malabaricus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 245–256, 2014. DOI. 10.1007/s10695-013-9840-4.

MIHUCZ, V. G.; ZÁRAY, G. Occurrence of antimony and phthalate esters in polyethylene terephthalate bottled drinking water. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 51, n. 3, p. 183–209, 2016. DOI. 10.1080/05704928.2015.1105243.

MONTELLA, I. R.; MARTINS, A. J.; VIANA-MEDEIROS, P. F.; LIMA, J. B. P.; BRAGA, I. A.; VALLE, D. The classification of esterases: an important gene family involved in

insecticide resistance - A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 4, p. 437–449, 2012. DOI. 10.1590/s0074-02762012000400001.

MORAIS, G. dos S. **Avaliação do efeito da exposição de *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981 (Diptera: Chironomidae) a butil benzil ftalato e antimônio**. 2018. Universidade Federal do Paraná, 2018.

MORAIS, G. dos S.; PESENTI, E. C.; CESTARI, M. M.; NAVARRO-SILVA, M. A. Genotoxic effect of Phenanthrene on *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae). **Zoologia**, v. 31, n. 4, p. 323–328, 2014. DOI. 10.1590/s1984-46702014000400003.

MORI, A.; ROMERO-SEVERSON, J.; BLACK IV, W. C.; SEVERSON, D. W. Quantitative trait loci determining autogeny and body size in the Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*). **Heredity**, v. 101, n. 1, p. 75–82, 2008. DOI. 10.1038/hdy.2008.32.Quantitative.

NICHOLLS, P. Classical catalase: Ancient and modern. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 525, n. 2, p. 95–101, 2012. DOI. 10.1016/j.abb.2012.01.015.

OEHLMANN, J.; SCHULTE-OEHLMANN, U.; KLOAS, W.; JAGNYTSCH, O.; LUTZ, I.; KUSK, K. O.; WOLLENBERGER, L.; SANTOS, E. M.; PAULL, G. C.; VAN LOOK, K. J. W.; TYLER, C. R. A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 364, n. 1, p. 2047–2062, jul. 2009. DOI. 10.1098/rstb.2008.0242.

PACKER, M. J.; CORBET, P. S. Size variation and reproductive success of female *Aedes punctor* (Diptera: Culicidae). **Ecological Entomology**, v. 14, n. 3, p. 297–309, ago. 1989. DOI. 10.1111/j.1365-2311.1989.tb00960.x.

PALAKSHA; SHAKUNTHALA, V. Variations in the esterase expression pattern with respect to different light regimes in *Drosophila agumbensis* and *Drosophila nagarholensis*. **Biological Rhythm Research**, v. 46, n. 4, p. 553–564, abr. 2015. DOI. 10.1080/09291016.2015.1026677.

PANG, Y.-P.; BRIMIJOIN, S.; RAGSDALE, D. W.; ZHU, K. Y.; SURANYI, R. Novel and Viable Acetylcholinesterase Target Site for Developing Effective and Environmentally Safe Insecticides. **Current Drug Targets**, v. 13, p. 471–482, 2012. DOI. 10.2174/138945012799499703.

PARK, K.; KWAK, I.-S. Molecular effects of endocrine-disrupting chemicals on the *Chironomus riparius* estrogen-related receptor gene. **Chemosphere**, v. 79, n. 9, p. 934–941, maio 2010. DOI. 10.1016/j.chemosphere.2010.03.002.

PEREZ, M. H.; NORIEGA, F. G. *Aedes aegypti* pharate 1st instar quiescence affects larval fitness and metal tolerance. **Journal of Insect Physiology**, v. 58, n. 1, p. 824–829, jun. 2012. DOI. 10.1016/j.jinsphys.2012.03.005.

PLANELLÓ, R.; HERRERO, Ó.; MARTÍNEZ-GUITARTE, J. L.; MORCILLO, G. Comparative effects of butyl benzyl phthalate (BBP) and di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on the aquatic larvae of *Chironomus riparius* based on gene expression assays related to the endocrine system, the stress response and ribosomes. **Aquatic Toxicology**, v. 105, n. 1–2, p. 62–70, set. 2011. DOI. 10.1016/j.aquatox.2011.05.011.

POWELL, J. R.; EVANS, B. R. How Much Does Inbreeding Reduce Heterozygosity? Empirical Results from *Aedes aegypti*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 1, p. 157–158, 2017. DOI. 10.4269/ajtmh.16-0693.

PRUD'HOMME, S. M.; CHAUMOT, A.; CASSAR, E.; DAVID, J.P.; REYNAUD, S. Impact

of micropollutants on the life-history traits of the mosquito *Aedes aegypti*: On the relevance of transgenerational studies. **Environmental Pollution**, v. 220, n. 1, p. 242–254, 2017. DOI. 10.1016/j.envpol.2016.09.056.

QU, R.; FENG, M.; SUN, P.; WANG, Z. A comparative study on antioxidant status combined with integrated biomarker response in *Carassius auratus* Fish exposed to nine phthalates. **Environmental Toxicology DOI**, v. 30, n. 10, p. 14247–14253, 2014. DOI. 10.1002/tox.

RAJAMANIKYAM, M.; VADLAPUDI, V.; PARVATHANENI, S. P.; KOUDE, D.; SRIPADI, P.; MISRA, S.; AMANCHY, R.; UPADHYAYULA, S. M. Isolation and characterization of phthalates from *brevibacterium mcbrellneri* that cause cytotoxicity and cell cycle arrest. **EXCLI Journal**, v. 16, p. 375–387, 2017. DOI. 10.17179/excli2017-145.

ROSS, P. A.; ENDERSBY-HARSHMAN, N. M.; HOFFMANN, A. A. A comprehensive assessment of inbreeding and laboratory adaptation in *Aedes aegypti* mosquitoes. **Evolutionary Applications**, v. bioRxiv 23, 2017. DOI. 10.1111/eva.12740.

SHI, H.; PEI, L.; GU, S.; ZHU, S.; WANG, Y.; ZHANG, Y.; LI, B. Glutathione S-transferase (GST) genes in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and comparative analysis with five additional insects. **Genomics**, v. 100, n. 5, p. 327–335, nov. 2012. DOI. 10.1016/j.ygeno.2012.07.010.

SIBLEY, P. K.; BENOIT, D. A.; ANKLEY, G. T. The significance of growth in *Chironomus tentans* sediment toxicity tests: relationship to reproduction and demographic endpoints. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 2, p. 336–345, 1997. DOI. 10.1002/etc.5620160232.

SIMOY, M. I.; SIMOY, M. V.; CANZIANI, G. A. The effect of temperature on the population dynamics of *Aedes aegypti*. **Ecological Modelling**, v. 314, n. 1, p. 100–110, 2015. DOI. 10.1016/j.ecolmodel.2015.07.007.

SINGHAL, S. S.; SINGH, S. P.; SINGHAL, P.; HORNE, D.; SINGHAL, J.; AWASTHI, S. Antioxidant role of glutathione S-transferases: 4-Hydroxynonenal, a key molecule in stress-mediated signaling. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 289, n. 3, p. 361–370, 2015. DOI. 10.1016/j.taap.2015.10.006.

SLICE, D. E. Landmark Coordinates Aligned by Procrustes Analysis Do Not Lie in Kendall's Shape Space. **Systematic Biology**, v. 50, n. 1, p. 141–149, 2001. DOI. 10.1080/10635150119110.

SRIKANATH, K.; PEREIRA, E.; DUARTE, A. C.; AHMAD, I. Glutathione and its dependent enzymes' modulatory responses to toxic metals and metalloids in fish - a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 4, p. 2133–2149, 2013. DOI. 10.1007/s11356-012-1459-y.

STRICKMAN, D. A.; KITTAYAPONG, P. Dengue and its vectors in Thailand: calculated transmission risk from total pupal counts of *Aedes aegypti* and association of wing-length measurements with aspects of the larval habitat. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 2, p. 209–217, 2003. DOI. 10.4269/ajtmh.2003.68.209.

U.S.EPA. **IRIS Toxicological Review of Butyl Benzyl Phthalate (BBP) (Preliminary Assessment Materials)** Washington, DC U.S. Environmental Protection Agency, 2014.

VALAVANIDIS, A.; VLAHOIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, n. 2, p. 178–189, 2006.

DOI. 10.1016/j.ecoenv.2005.03.013.

VALLE, D.; MONTELLA, I. R. Quantification methodology for enzyme activity related to insecticide resistance in *Aedes aegypti*. **Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 1, p. 128, 2006.

VIDAL, P. O.; CARVALHO, E.; SUESDEK, L. Temporal variation of wing geometry in *Aedes albopictus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 8, p. 1030–1034, dez. 2012. DOI. 10.1590/s0074-02762012000800011.

WANG, J. X.; XI, Y. L.; HU, K.; LIU, X. B. Effect of butyl benzyl phthalate on life table-demography of two successive generations of cladoceran *Moina macrocopa* Straus. **Journal of Environmental Biology**, v. 32, n. 1, p. 17–22, 2011.

WANG, W.; ZHANG, Y.; WANG, S.; FAN, C. Q.; XU, H. Distributions of phthalic esters carried by total suspended particulates in Nanjing, China. **Environmental monitoring and assessment**, v. 184, n. 11, p. 6789–6798, nov. 2012. DOI. 10.1007/s10661-011-2458-z.

ZELLER, M.; KOELLA, J. C. Effects of food variability on growth and reproduction of *Aedes aegypti*. **Ecology and Evolution**, v. 6, n. 2, p. 552–559, 2016. DOI. 10.1002/ece3.1888.

CAPÍTULO II

EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS EM *Aedes (Stegomyia) aegypti* (LINNAEUS, 1762) (DIPTERA: CULICIDAE) EXPOSTOS A ANTIMÔNIO

RESUMO

O metaloide antimônio, encontrado naturalmente no ambiente, e seus compostos são empregados na fabricação do PET e como retardadores de chama. Entram em contato com os organismos aquáticos principalmente pela produção industrial e da queima de resíduos sólidos e está incluso na lista de xenobióticos que apresentam riscos ambientais. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do antimônio sobre os parâmetros biológicos, o metabolismo enzimático e danos ao DNA em *A. aegypti*, que além de relevante como vetor de agentes etiológicos, pode ser utilizado como um modelo para estudos de toxicidade. Populações de laboratório e de campo foram submetidas a cinco concentrações de antimônio variando de 0,005 mg.L⁻¹ a 1,5 mg.L⁻¹ em exposição aguda (48h), e às concentrações 0,005 mg.L⁻¹, 0,05 mg.L⁻¹ e 0,5 mg.L⁻¹ em exposições subcrônica (cinco dias) e crônica (15 dias), em comparação aos controles água e HCl. A determinação da quantidade real de antimônio na água foi realizada por IOP-OES. Para verificar os danos genotóxicos foram realizados ensaios cometa alcalino, e para analisar os efeitos no metabolismo, foram realizadas as quantificações da atividade enzimática de AChE, EST- α , EST- β , GST, SOD e CAT e a verificação de danos de peroxidação lipídica. Para os efeitos na biologia e desenvolvimento, foram avaliados sobrevivência, tempo e taxa de emergência de machos e fêmeas e a razão sexual. O antimônio provocou danos ao DNA em exposição crônica e, em exposição aguda, somente na concentração 1,5 mg.L⁻¹. Não houve alteração na atividade da acetilcolinesterase. O antimônio ativou a ação das enzimas de biotransformação de fases I e II apenas na concentração 1,0 mg.L⁻¹ na população de campo em exposição aguda, não sendo observada toxicidade nos demais tratamentos, populações e tempos de exposição. SOD, CAT e aumento na concentração de hidroperóxidos evidenciaram alterações na via de defesa ao estresse oxidativo. Nos dados obtidos sobre os parâmetros biológicos, o ciclo de vida foi mais longo na população de laboratório, a razão sexual foi positiva para as fêmeas em todas as exposições na população de campo e no controle solvente e na maior concentração na população de campo. Os resultados indicam que o antimônio apresenta ação tóxica na biologia e desenvolvimento de *A. aegypti* em diversos níveis de organização biológica, provocando consequências negativas desde a escala celular à populacional.

Palavras-chave: genotoxicidade, metabolismo, parâmetros biológicos.

1 INTRODUÇÃO

O antimônio (Sb) é tecnicamente classificado como um metaloide e é um dos elementos naturais mais raros devido a sua forte afinidade para o enxofre e metais, tais como cobre, chumbo e prata (ANDERSON, 2012). Seu uso principal é como ingrediente de ligas que conferem dureza, força, corrosão e outras propriedades, mas também são utilizados na fabricação de PET (tereftalato de polietileno), no setor automotivo, na produção de eletrodos de baterias, em soldas, munições, tubos resistentes à corrosão e revestimento de cabos (ANDERSON, 2012; USEPA, 2014), como retardadores de chama, tintas, semicondutores, metais de baixa fricção e cerâmicas (FU et al., 2016). No PVC atua como um estabilizador de calor, impedindo a liberação do cloro em exposição a altas temperaturas e luz ultravioleta (ANDERSON, 2012).

O antimônio entra no ambiente por processos naturais, como a erosão das rochas e do escoamento do solo, e pelas atividades antropogênicas, como fontes de mineração, emissões industriais, queima de combustíveis fósseis e incineração de resíduos. A principal forma de exposição ao antimônio é por meio do alimento e da água (TELFORD et al., 2009; WANG et al., 2011b). Compostos de antimônio apresentam baixa solubilidade no solo e mobilidade limitada, dependendo do seu estado de oxidação, da natureza dos substratos disponíveis para adsorção e da composição da matriz aquosa (WILSON et al., 2010). As quantidades que podem ser liberadas não apresentam preocupações significativas para os organismos do solo. Porém, durante os processos de tratamento de águas residuais, o antimônio entra no ambiente por meio de efluentes e são diluídos em diferentes graus em riachos, lagos, estuários e oceanos, proporcionando a exposição a organismos aquáticos e bentônicos (USEPA, 2014).

O antimônio possui quatro estados de oxidação na natureza, (-3, 0, +3, +5), que influenciam em sua toxicidade. As espécies trivalentes (SbIII) e pentavalentes (SbV) são os mais abundantes (GEBEL, 1997). As espécies trivalentes, como o trióxido de antimônio (ATO), são bem mais tóxicas do que as demais espécies por apresentarem elevada afinidade com os eritrócitos sanguíneos (FERREIRA et al., 2014). Além disso, o ATO (Sb₂O₃) é o composto de antimônio economicamente mais relevante, pois cerca de 80% da produção da mina de antimônio é convertida em ATO, sendo utilizados ligados a metais ou diretamente em produto.

A toxicidade de antimônio e seus compostos tem sido motivo de preocupação em todo o mundo e estão sujeitas a uma série de regulamentos por vários meios ambientais. A Organização Mundial da Saúde estabelece como concentração máxima admissível de antimônio em água potável o valor de 0,02 mg.L⁻¹ (WHO, 2011) e a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos de 0,006 mg.L⁻¹ (USEPA, 2014). No Brasil, a

resolução do CONAMA nº 357/2005 permite o valor máximo de 0,005 mg.L⁻¹ de antimônio em água doce e a resolução do CONAMA nº 452/2012 classifica o antimônio e seus compostos como resíduos perigosos.

Pouco se sabe sobre a carcinogenicidade e os mecanismos de ação do antimônio e seus compostos em seres humanos, embora a Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer os classifiquem como possivelmente cancerígeno (WHO, 2011). A USEPA (2014) inclui o composto na categoria de risco ao sistema respiratório, pois ocasiona inflamação intersticial crônica, inflamação nos pulmões e bronquite. Também pode induzir outros problemas de saúde como gastrite, irritação na pele, nos olhos e doenças cardíacas (BEYERSMANN; HARTWIG, 2008; USEPA, 2014). Em experimentos com animais, a inalação de trióxido de antimônio e de trissulfato de antimônio causou um aumento na incidência de tumores pulmonares (BEYERSMANN; HARTWIG, 2008; FERREIRA et al., 2014).

Além disso, são considerados interferentes endócrinos. Alguns efeitos citados na literatura têm sido associados à exposição de espécies de animais a esses desreguladores, tais como diminuição na eclosão de ovos de pássaros, peixes e tartarugas, feminilização de peixes machos, problemas no sistema reprodutivo em peixes, répteis, pássaros e mamíferos, e alterações no sistema imunológico de mamíferos marinhos. Em seres humanos, esses efeitos incluem a redução da quantidade de esperma, o aumento da incidência de câncer de mama, de testículo e de próstata (GHISELLI; JARDIM, 2007).

Recentemente, há evidências que sugerem que os mosquitos estão se tornando cada vez mais tolerantes à poluição por metais e metaloides e estão explorando novos habitats em áreas urbanas altamente poluídas, elevando o risco de disseminação de doenças transmitidas por mosquitos (MIREJI et al., 2010, 2011). Devido à sua recente inclusão na lista de xenobióticos que apresentam riscos ambientais e às diversas propriedades tóxicas conhecidas dos compostos de antimônio, o presente trabalho busca avaliar os efeitos das exposições aguda, subcrônica e crônica do antimônio em *Aedes aegypti* em diferentes níveis organizacionais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Fluxograma de trabalho

A metodologia de trabalho está representada na figura 15. O estudo foi separado nas áreas de atuação de campo e de laboratório, de acordo com a origem das populações de *A. aegypti*, sendo as análises idênticas e passíveis de comparação.

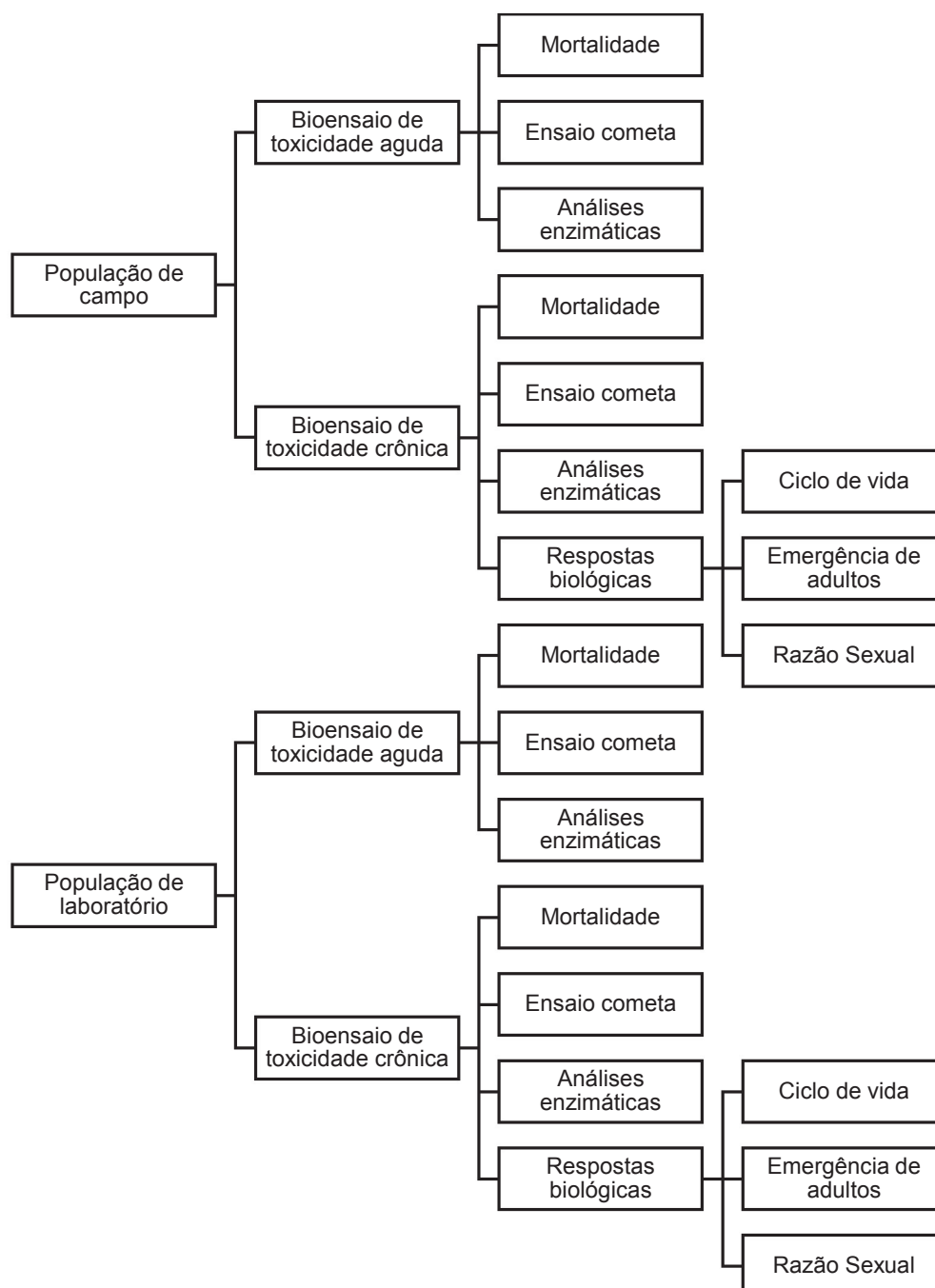


Figura 15. Fluxograma das atividades realizadas nos ensaios de toxicidade ao antimônio.

2.2 Material Biológico

2.2.1 População de campo

A população de campo utilizada foi coletada em 2015 no município de Londrina, Paraná e fornecida pelo Departamento de Biologia Animal e Vegetal da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Para a coleta de ovos, foram espalhadas ovitrampas pela cidade, que consistem em recipientes pretos contendo uma palheta de madeira em posição vertical e parcialmente preenchido com água, a fim de proporcionar um substrato para a oviposição das fêmeas de *Aedes aegypti* (GOMES, 1998). As palhetas que continham ovos, consideradas positivas, foram enviadas ao Laboratório de Morfologia e Fisiologia de Culicidae e Chironomidae (UFPR), onde foi realizada a criação.

Para a indução da eclosão das larvas, as palhetas foram colocadas em água desclorada, com fornecimento de ração de gato triturada diariamente como alimento, e depositados em câmaras do tipo B.O.D. sob condições de $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ de temperatura, 80% de umidade e fotoperíodo de 12/12 horas. Ao atingir o estágio de pupas, estas foram transferidas para gaiolas de criação até a emergência dos adultos, e então realizada a triagem das espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* e a contagem do número de adultos machos e fêmeas.

Os adultos permaneceram em gaiolas para a criação da geração F1, alimentados diariamente com solução de mel e água desclorada. Como fonte de alimentação sanguínea foram fornecidos camundongos *Mus musculus* utilizando os procedimentos aprovados pelo Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/BIO/UFPR (Protocolo nº 719). Após 72h da oferta do repasto sanguíneo, tempo necessário para a maturação dos ovos (GOMES et al, 2006), recipientes pretos contendo papel filtro molhados foram colocados nas gaiolas como substrato para a oviposição das fêmeas. Os papéis com ovos foram colocados para secar, armazenados e identificados.

2.2.2 Colônia Rockefeller

A colônia de *Aedes aegypti* referência de suscetibilidade a inseticidas químicos, denominada Rockefeller, foi mantida em sala isolada no Laboratório de Morfologia e Fisiologia de Culicidae e Chironomidae (UFPR) sob as mesmas condições de criação da população de campo.

A denominação utilizada no trabalho para fazer referência a esta população foi população de laboratório.

2.3 Ensaio de toxicidade

2.3.1 Condições gerais dos ensaios

Os papéis filtro contendo os ovos foram colocados para eclosão em água reconstituída (Solução de estoque I [sulfato de cálcio (CaSO_4) a $8,7 \mu\text{M}$; 1000 ml água destilada] e solução de estoque II [Cloreto de potássio (KCl) a $2,7 \mu\text{M}$; bicarbonato de sódio (NaHCO_3) a $57 \mu\text{M}$; sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) a $24,7 \mu\text{M}$; 1000 ml água destilada]), com parâmetros de dureza de 16 mg.L^{-1} ; pH entre 7,2 e 7,6 e condutividade de $160 \mu\text{S/cm}$. Após 24h, parte das larvas foi separada para a realização dos ensaios de toxicidade subcrônica e crônica e o restante mantida em criação até o quinto dia para realização dos ensaios de toxicidade aguda.

A solução de uso de antimônio (1.000 mg.L^{-1}) foi preparada por meio da diluição da solução estoque de Sb (99% da Sigma Aldrich®; Lote 230898) em ácido clorídrico (HCl 37% P.A.) e posterior diluição em etanol (P.A.). Foram utilizados como controles uma solução apenas com água reconstituída (controle água) e outra solução contendo água reconstituída, etanol (P.A.) e ácido clorídrico (P.A.) (proporção 25:1) (controle solvente).

Os parâmetros dos ensaios e as concentrações das soluções foram iguais para ambas as populações de *A. aegypti* avaliadas. Ao início e ao final de cada ensaio foram coletados dados das variáveis físico-químicas que podem afetar a expressão da toxicidade (COSTA et al., 2008), como oxigênio dissolvido, temperatura, salinidade, condutividade, produtos sólidos totais e pH.

2.3.2 Ensaio de Toxicidade Aguda

Os ensaios de exposição aguda com as populações de campo e laboratório foram realizados em recipientes de vidro de 300 ml, em quatro réplicas contendo 20 larvas de *A. aegypti* em terceiro instar final ou início do quarto instar para cada concentração. Foram realizadas três repetições dos ensaios a fim de obter a quantidade de amostras necessárias para os ensaios genotóxicos e bioquímicos, sendo utilizadas 240 larvas por grupo, 1.680 para cada população, totalizando 3.360 larvas. As larvas foram mantidas em câmara do tipo B.O.D. sob as mesmas condições da criação, porém, após a exposição ao antimônio, não houve mais fornecimento de alimento. As leituras dos testes foram feitas após 48h e calculada a taxa de mortalidade das larvas.

Para a escolha das concentrações utilizadas nos ensaios, foram feitos testes preliminares com sete diluições entre $0,001 \text{ mg.L}^{-1}$ e 5 mg.L^{-1} , tendo como base inicial o

limite máximo de 0,005 mg.L⁻¹ determinado para a presença de compostos de antimônio para água doce no Brasil, determinado pelo CONAMA 357 (2005). Após análise dos dados de mortalidade, foram escolhidas as concentrações subletais apresentadas na Tabela VIII. Os dados dos parâmetros físico-químicos coletados no início e no final dos ensaios estão apresentados na Tabela IX.

Tabela VIII. Concentrações de antimônio e solvente HCl utilizadas nos ensaios de toxicidade aguda com as populações de campo e de laboratório. CA = controle água; CS = controle solvente; Sol = solução de ATO preparada para o uso diário no ensaio; * Limite máximo determinado pelo CONAMA 57 (2005).

		Concentrações (mg.L ⁻¹)	Antimônio (μl)	Solvente (μl)	Volume total (ml)
	CA	-	0	0	100
	CS	-	0	510	100
Sol 1	C1	0,005*	50	460	100
	C2	0,05	500	10	100
	C3	0,5	125	385	100
Sol 2	C4	1,0	250	260	100
	C5	1,5	375	135	100

Tabela IX. Média dos parâmetros físico-químicos em período inicial e final do ensaio crônico em exposição a BBP nas populações de campo e de laboratório. TDS = produtos sólidos totais; DO = oxigênio dissolvido.

Período	pH	Temperatura (°C)	Condutividade (μS)	Salinidade (ppmS)	TDS (mg.L ⁻¹)	DO (mg.L ⁻¹)
Inicial	6,1	19,6	163,6	77,9	110,0	7,4
Final	6,2	21,4	165,2	91,8	11,7	7,4

2.3.3. Ensaios de Toxicidade Subcrônica e Crônica

Os ensaios subcrônicos e crônicos com as populações de campo e laboratório foram realizados em aquários de vidro de dimensões 10 cm x 21 cm x 10,5 cm, em três réplicas contendo 700 ml de água reconstituída, 5 ml de ração líquida (25 g ração Tetramin®; 1000 ml de água destilada) e 100 larvas de *A. aegypti* de primeiro instar para cada concentração. Foram realizadas três repetições dos ensaios a fim de obter a quantidade de material necessário para as análises posteriores, sendo utilizadas 900 larvas por concentração, 4.500 para cada população, totalizando 9.000 larvas. Os ensaios foram realizados mantendo-se as mesmas condições da criação, porém com

fornecimento de 2 ml de ração líquida a cada 48h, sob aeração constante para evitar a proliferação de fungos.

O ensaio subcrônico teve duração de cinco dias, em que parte das larvas foi retirada e armazenada para os ensaios genotóxicos e bioquímicos. O ensaio crônico teve duração de 14 dias, no qual a outra parte das larvas foi mantida nos aquários até o estágio de pupa, contabilizadas e colocadas em recipientes de coleta até a emergência dos adultos. Estes foram armazenados para avaliação dos parâmetros biológicos.

Para a escolha das concentrações utilizadas nos ensaios, foram feitos testes preliminares com as mesmas diluições utilizadas nos ensaios agudos. Após análise dos dados de mortalidade, foram escolhidas as três menores concentrações, pois as demais apresentaram resultados letais (Tabela X). Semanalmente, a solução do ensaio foi substituída por uma nova, para evitar alteração da concentração do Sb, evaporação e aumento da turbidez da água. Os dados dos parâmetros físico-químicos coletados no início e no final dos ensaios estão apresentados na Tabela XI.

Tabela X. Concentrações de antimônio e solvente HCl utilizadas nos ensaios de toxicidade crônica com as populações de campo e de laboratório. CA = controle água; CS = controle solvente; Sol = solução de ATO preparada para o uso diário no ensaio.

		Concentrações (mg.L ⁻¹)	Antimônio (μl)	Solvente (μl)	Ração líquida (μl)	Volume final (ml)
	CA	-	0	0	5000	700
	CS	-	0	1450	5000	700
Sol 1	C1	0,005	35	1415	5000	700
	C2	0,05	350	1100	5000	700
Sol 2	C3	0,5	350	1100	5000	700

Tabela XI. Média dos parâmetros físico-químicos em período inicial e final do ensaio crônico em exposição a BBP nas populações de campo e de laboratório. TDS = produtos sólidos totais; DO = oxigênio dissolvido.

Período	pH	Temperatura (°C)	Condutividade (μS)	Salinidade (ppmS)	TDS (mg.L ⁻¹)	DO (mg.L ⁻¹)
Inicial	6,3	19,6	118,3	61,4	80,7	6,9
Final	6,9	18,8	97,6	46,7	69,1	1,6

2.3.4 Quantificação do antimônio

A análise química para a determinação das concentrações reais do antimônio na água foi realizada pelo Grupo de Química Ambiental da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Para cada concentração e grupos controles, 10 ml de amostra foram retiradas em triplicata no início e no final do bioensaio, filtradas em filtros de PTFE de 45 μm e armazenadas em vials âmbar a 4 °C até a realização da análise. O mesmo procedimento foi feito para os bioensaios de toxicidade aguda e crônica.

A técnica utilizada para a quantificação química foi espectrometria de emissão óptica por plasma indutivamente acoplado (ICP OES - *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*), conforme descrito em tese de Moraes et al. (2018). O aparelho utilizado foi espectrômetro da Thermo Scientific, modelo ICAP 6500, operando com visão axial.

Para as amostras com valor nominal maior que 0,01 mg.L^{-1} foi usado o sistema de nebulização convencional, sendo utilizados ácido nítrico 14 mol.L^{-1} e solução padrão de 1000 mg.L^{-1} de Sb, utilizando água Milli-Q® (18 M Ω). Para as amostras com valor nominal menor que 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ foi utilizado o sistema de CVG (*Chemical Vapor Generation*), sendo preparadas soluções de ácido clorídrico (HCl) a 3 mol.L^{-1} e borohidreto de sódio (NaBH_4) a 1% (m.v.) em 0,4% de hidróxido de sódio (NaOH).

As curvas de calibração foram preparadas em meio de HNO_3 0,14 mol.L^{-1} , incluindo a prova em branco, utilizando soluções padrão na faixa de concentração de 0,010 mg.L^{-1} a 2,0 mg.L^{-1} . Para o sistema de CVG, a curva analítica foi preparada na faixa de 0,2 a 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Para ambos os sistemas de introdução de amostra, o coeficiente de correlação linear obtido foi superior a 0,99, atendendo assim, os critérios de linearidade.

2.4 Biomarcador de genotoxicidade

A técnica utilizada para detecção de danos ao DNA nas populações de campo e laboratório, após exposições aguda e subcrônica, foi o ensaio cometa alcalino, seguindo o protocolo de Lee e Choi (2006) modificado por Moraes et al. (2014).

Larvas de *A. aegypti* foram acondicionadas em 500 μL de soro bovino fetal por no máximo 48h, homogeneizadas e centrifugadas a 1000 rpm por cinco minutos. Após descartar o sobrenadante, as células foram ressuspensas em vórtex. 100 μL da suspensão foram adicionadas a 100 μL de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) a 1% (0,1 g de LMP; 20 ml de PBS) e espalhadas em lâminas previamente recobertas por uma camada de agarose normal a 1,5% (1,5 g; 100 ml de PBS). Estas foram cobertas

com lamínulas e mantidas sob refrigeração por um período de 10 a 20 min. Posteriormente, as lamínulas foram retiradas e as lâminas colocadas em solução de lise (10 mM Tris; 100 mM ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 2,5 M cloreto de sódio (NaCl); dimetilsulfóxido (DMSO) a 10%). Após 24 horas, as lâminas foram retiradas da solução de lise e mantidas em solução alcalina com pH>13 (300 mM NaOH; 1 mM EDTA) por 30 min para a desnaturação do DNA. Em seguida, foram submetidas à eletroforese a 4 °C (25 V e 300 mA) por 25 min. Ao término da corrida, as lâminas foram neutralizadas com 0,4 M Tris (pH = 7,5) por 15 min e fixadas com etanol absoluto por cinco minutos. Após secas, as lâminas foram coradas com 15 µL de Brometo de Etídio (20 µg.mL⁻¹).

Neste teste, após as células inseridas na agarose passarem pela lise celular e pela eletroforese, o DNA fragmentado migra para o pólo positivo da cuba de eletroforese, enquanto o DNA intacto permanece agrupado, formando uma cauda semelhante a um cometa, que dá nome ao teste (AZQUETA et al., 2011a).

As lâminas foram observadas em teste cego, em microscópio de epifluorescência sob aumento de 400x. Em cada lâmina analisada foi determinado o nível de dano correspondente utilizando a classificação de Kobayashi et al., (1995) (0 = sem dano aparente; 1 = dano pequeno; 2 = dano médio; 3 = dano extenso; 4 = dano máximo) e o escore foi calculado de acordo com Collins (2004).

Para cada grupo avaliado foram produzidas 10 lâminas com pools de seis larvas cada, totalizando 1.440 larvas, sendo 840 para os ensaios de toxicidade aguda e 600 para os ensaios de toxicidade subcrônica. Foram examinadas 50 nucleóides por lâmina (Tabela XII).

Tabela XII. Número de larvas de laboratório e campo em exposições aguda e subcrônica utilizadas nos ensaios cometa.

População	Tempo exposição	Número grupos	Lâminas	Larvas por pool	Total Larvas	Número nucleóides por lâmina	Número total de células
Campo	Agudo	7	10	6	420	50	3.500
	Crônico	5	10	6	300	50	2.500
Laboratório	Agudo	7	10	6	420	50	3.500
	Crônico	5	10	6	300	50	2.500
Total					1.440		12.000

2.5 Biomarcadores bioquímicos

As larvas retiradas dos ensaios de toxicidade aguda e subcrônica foram separadas em 20 pools de cinco larvas por concentração e grupos controle,

armazenadas ainda vivas, a seco, em microtubos de 1,5 ml e congeladas a -80 °C de temperatura.

Para a preparação dos ensaios enzimáticos, o *pool* com as larvas foi homogeneizado em 620 µl de água deionizada (Milli-Q®), com auxílio de homogeneizador automático. As alíquotas para o ensaio de AChE foram separadas e o restante da amostra centrifugado a 10.850 rpm por 60 segundos em centrífuga refrigerada a 4 °C. As reações para cada enzima foram realizadas em triplicata em microplacas transparentes de 96 poços e a absorbância final lida em espectrofotômetro de microplacas.

Cada enzima apresenta um protocolo, um tempo de reação e uma unidade de medida específica. Durante todo o processo, os tubos e as microplacas contendo os homogenatos foram mantidos em gelo a fim de inibir a formação de EROS e reduzir a proteólise.

2.5.1 Acetilcolinesterase (AChE)

A partir do volume total de homogenato, alíquotas de 25 µl foram distribuídas em três réplicas em microplaca, adicionados 200 µl de DTNB (5,5-Ditio-bis-2nitro-benzoato; 0,75 mM) e 50 µl de ATC (iodeto de acetilticolina; 10 mM), e encubadas por 30 min em temperatura e luz ambiente. A leitura cinética foi feita em comprimento de onda de 405 nm, a cada minuto durante cinco minutos, de acordo com o método de Ellman et al. (1961) modificado para microplaca por Dizer et al. (2001). Os resultados foram expressos em nmol/min/mg proteína.

2.5.2 Esterases α e β (α -EST e β -EST)

Os ensaios para α -EST e β -EST seguiu o protocolo de Valle e Montella (2006), com reagentes similares utilizados para ambas as enzimas, havendo, no entanto, as substituições de α -naftil e α -naftol na enzima α -EST por β -naftil e β -naftol em β -EST.

O método baseia-se no consumo do substrato α -naftil pela enzima α -EST transformando-o em α -naftol. Ao acrescentar o corante Fast blue, a reação cessa imediatamente e a quantidade do produto α -naftol pode ser medida por meio da coloração produzida (VALLE; MONTELLA, 2006).

Portanto, 10 µl de amostra foram distribuídas em três réplicas em microplaca e adicionados 200 µl de alfa-naftil acetato/Na fosfato (0,3 mM). Após 15 min de incubação em luz e temperatura ambiente, foram acrescentados 50 µl de Fast blue (0,3%), incubado por cinco minutos e realizada a leitura *endpoint* a 570 nm. Foi feita curva padrão com α -naftol

(0,3 mg.L⁻¹) para a conversão dos valores de absorbância em conteúdo de α -naftol. Os resultados foram expressos em nmol de alfa naftol/mg de proteína/min.

2.5.3 Glutathione S-Transferase (GST)

O protocolo utilizado para GST foi o proposto por Hemingway (1998). Alíquotas de 15 μ l de amostra foram distribuídas em três réplicas em microplaca e acrescentados 195 μ l da solução de reação composta por CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno; 21 mM) e GSH (glutathione reduzida; 10 nM). A absorvidade molar do produto da reação foi 4,39 mM⁻¹cm⁻¹. A leitura cinética foi feita em comprimento de onda de 340 nm, a cada minuto durante 20 min e a atividade foi expressa em nmoles/mg ptn/min, ou seja, quantidade do produto de reação gerado por minuto, por mg de proteína.

2.5.4 Catalase (CAT)

O protocolo utilizado para CAT seguiu o proposto por Aebi (1984), com modificações. Alíquotas de 5 μ l de amostra foram distribuídas em três réplicas em microplaca e acrescentados 295 μ l de solução reação a 80mM (Tampão Tris 1M/EDTA 5mM, peróxido de hidrogênio 3% e água Milli-Q®). O método consiste no consumo de peróxido de hidrogênio exógeno por meio da atividade da catalase, gerando oxigênio e água. O coeficiente de absorvidade molar para H₂O₂ de 40 M⁻¹cm⁻¹ foi utilizado para calcular a atividade da enzima (HUGO AEBI, 1984). A reação foi lida em comprimento de onda de 240 nm a cada 15 seg por cinco minutos e a atividade expressa em μ mol/min/mg proteína.

2.5.5 Peroxidação Lipídica (LPO)

A análise da peroxidação lipídica (LPO) ocorre por meio da avaliação da concentração de hidroperóxidos do ensaio FOX seguindo a metodologia de Jiang et al. (1992). Em microtubos de 1,5 ml, foram adicionados 70 μ l de metanol P.A. a 70 μ l de amostra, centrifugados a 7.020 rpm por cinco minutos a 4 °C de temperatura. Foram transferidos 100 μ l de sobrenadante para um novo microtubo e acrescentados 900 μ l de reativo de FOX 2, composto por solução metanólica (laranja de xilenol 0,1 mM; BHT 4 mM (hidroxitolueno butilado cristalino); metanol) e solução de sulfato ferroso amoniacal 2500 μ M (sulfato ferroso amoniacal; ácido sulfúrico 250 mM). As amostras foram incubadas no escuro por 30 min, sendo agitados a cada três minutos. Em seguida, 300 μ l desta solução foram distribuídas em microplacas em três réplicas e lidas em

comprimento de onda de 560 nm. Para determinar a concentração de hidroperóxidos, o coeficiente de absorvidade molar do H_2O_2 utilizado foi de $4.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Os resultados foram expressos em concentração de hidroperóxidos/mg proteína.

2.5.6 Superóxido-Dismutase (SOD)

A análise da atividade da SOD foi realizada seguindo o método proposto por Gao (1998). Em microtubos de 1,5 ml, foram adicionados, em duplicata, 40 μl de amostra, 885 μl de tampão (Tris-base 1 M; EDTA 5 mM) e 50 μl de pirogalol (20 mM), incubados por 30 minutos, e acrescentados 25 μl de HCl (1N) para a interrupção da reação. Em microplaca, foram adicionados 300 μl da amostra em triplicata. A leitura *endpoint* foi feita em comprimento de onda de 440 nm. Um controle por amostra foi realizado simultaneamente com adição de todos os reagentes, porém sem incubação. A quantidade de SOD que inibiu a reação em 50% (IC50) equivale a 1 unidade (U) de SOD. Os resultados foram expressos em U de SOD/mg de proteína.

2.5.7 Proteína Total (PTN)

A quantidade de proteína total seguiu o método descrito por Bradford (1976). Alíquotas de 10 μl de amostra foram distribuídas em três réplicas em microplaca, seguidos pela adição de 250 μl do reativo Bradford diluído em água Milli-Q® (1:5). Para o controle positivo, foram acrescentados também 10 μl de BSA (albumina sérica bovina). A leitura *endpoint* ocorreu a 620 nm. A conversão de valores de absorbância em valores de proteína total foi realizada com a curva padrão de BSA em diferentes concentrações.

2.6 Parâmetros biológicos

Para a análise do tempo de desenvolvimento, durante os ensaios de toxicidade crônica (14 dias), foram registradas as datas de início da exposição, de mudança para o estágio de pupa e de emergência dos adultos, tanto machos quanto fêmeas. Paralelamente, foi feita a contagem do número de indivíduos em cada estágio de desenvolvimento. Os adultos, ao final do bioensaio, foram retirados do recipiente de coleta e armazenados separadamente por sexo a -20°C .

Por meio da análise desses parâmetros foi possível determinar o tempo de desenvolvimento, atrasos no ciclo de vida, mortalidade larval, razão sexual e densidade populacional dos organismos.

2.7 Análise dos Dados

Em todos os ensaios, os grupos controles água e solvente foram comparados por meio do teste-t no programa Past 3.13 e descartado o controle água quando $p > 0,05$, ou mantidos ambos os controles quando $p < 0,05$.

As análises estatísticas para o ensaio cometa foram Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunnett ($p < 0,05$), realizadas no programa Graphpad Prism 8.0. Os gráficos foram gerados no programa Excel 2013. Para o ensaio campo em exposição subcrônica, os controles água e solvente não foram significativamente diferentes, portanto foram feitas as análises utilizando os controles separadamente comparados aos tratamentos.

Para a razão sexual foi utilizado o teste qui-quadrado (χ^2) ($p < 0,05$) e para os ensaios bioquímicos e parâmetros biológicos, a normalidade e a homogeneidade da variância foi verificada pelo teste Shapiro-Wilk e os tratamentos analisados por meio do teste de variância ANOVA de um fator com pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). Todas as análises foram realizadas no programa Past 3.13 e os gráficos gerados no programa Excel 2013.

3. RESULTADOS

3.1 Quantificação do antimônio

Os valores dos controles água e solvente foram nulos tanto no início quanto no final dos ensaios agudos e crônicos em ambas as populações expostas (Tabela XIII).

No ensaio agudo as concentrações reais iniciais do antimônio foram as esperadas para ambas as populações. Comparando as concentrações reais iniciais e finais, na população de campo os tratamentos que apresentaram diferença significativa foram $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$, $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ e $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$, enquanto na população de laboratório, apenas a maior concentração foi significativamente diferente, havendo aumento da concentração real ao final das 48h.

No ensaio crônico, o valor real inicial encontrado na população de campo foi igual para a concentração nominal $0,005 \text{ mg.L}^{-1}$ e abaixo do estimado para as concentrações nominais $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$. Na menor concentração ($0,005 \text{ mg.L}^{-1}$) houve aumento significativo na concentração real final. Apenas na maior ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) concentração houve redução ao final do ensaio, embora não seja significativamente diferente.

Houve contaminação das amostras na população de laboratório coletadas e armazenadas após a realização dos ensaios de toxicidade. Embora estes continuem válidos, não foi possível realizar a quantificação do antimônio na água.

Tabela XIII. Concentrações nominais e concentrações reais (em mg.L^{-1}) de antimônio em período inicial e final em populações de campo e de laboratório após exposições aguda (48 horas) e crônica (17 dias). O símbolo (-) indica ausência de diferenças significativas e o símbolo (*) indica diferença significativa entre as concentrações reais iniciais e finais (ANOVA Kruskal-Wallis com pós-teste de Tukey's; $p < 0,05$).

Exposição	Concentração nominal	Campo			Laboratório		
		Concentração real Inicial	Concentração real Final	ANOVA	Concentração real Inicial	Concentração real Final	ANOVA
Aguda	CA	<0,0002	<0,0002	-	<0,0002	<0,0002	-
	CS	<0,0002	<0,0002	-	<0,0002	<0,0002	-
	0,005	0,0047	0,0055	-	0,0051	0,0052	-
	0,05	0,0493	0,0643	*	0,0460	0,0493	-
	0,5	0,49	0,62	*	0,40	0,42	-
	1,0	1,03	1,05	-	0,72	0,93	-
	1,5	1,38	1,56	*	1,19	1,38	*
Crônica	CA	<0,0002	<0,0002	-			
	CS	<0,0002	<0,0002	-			
	0,005	0,0054	0,0147	*			
	0,05	0,0135	0,0180	-			
	0,5	0,17	0,10	-			

3.2 Mortalidade

A mortalidade das larvas de campo (Figura 16A) em exposição aguda (48 horas) a antimônio foi observada a partir da concentração $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ com 3,2% de mortalidade e atingiu o máximo de 21,4% na maior concentração exposta ($1,5 \text{ mg.L}^{-1}$). Nas larvas de laboratório (Figura 16B), a mortalidade em exposição aguda foi menor que 1% nos grupos controles e nas três concentrações iniciais, aumentando para 4,2% na concentração $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ e chegando ao máximo de 17,4% na concentração $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$.

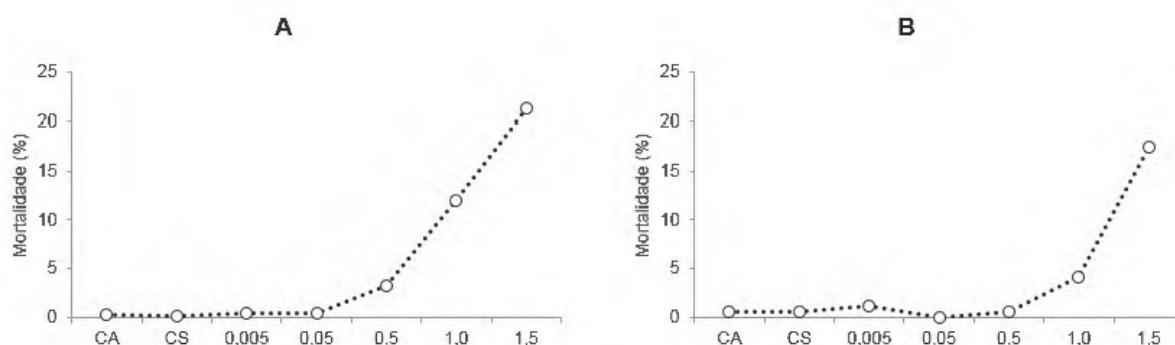


Figura 16. Porcentagem média de mortalidade de larvas de *A. aegypti* em exposição a concentrações nominais de antimônio (mg.L^{-1}) e grupos controles água (CA) e solvente (CS). (A) Exposição aguda em larvas de campo; (B) Exposição aguda em larvas de laboratório; (C) Exposição subcrônica em larvas de campo; (D) Exposição subcrônica em larvas de laboratório.

3.3 Biomarcador de genotoxicidade

O metaloide antimônio não ocasionou danos ao DNA em exposição aguda em larvas de *A. aegypti* de campo (Figura 17A). Em larvas de laboratório (Figura 17B) sofreram aumento significativo do dano somente na maior concentração ($1,5 \text{ mg.L}^{-1}$).

Em exposição subcrônica, na população de campo (Figura 17C) os controles água e solvente foram significativamente diferentes entre si, portanto foram comparados separadamente os tratamentos e os grupos controles. Todas as concentrações sofreram aumento significativo de dano ao DNA em relação ao controle água; em relação ao controle solvente não houve diferença. As larvas de laboratório (Figura 17D) tiveram aumento significativo em relação ao controle solvente nas duas maiores concentrações ($0,005 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$).

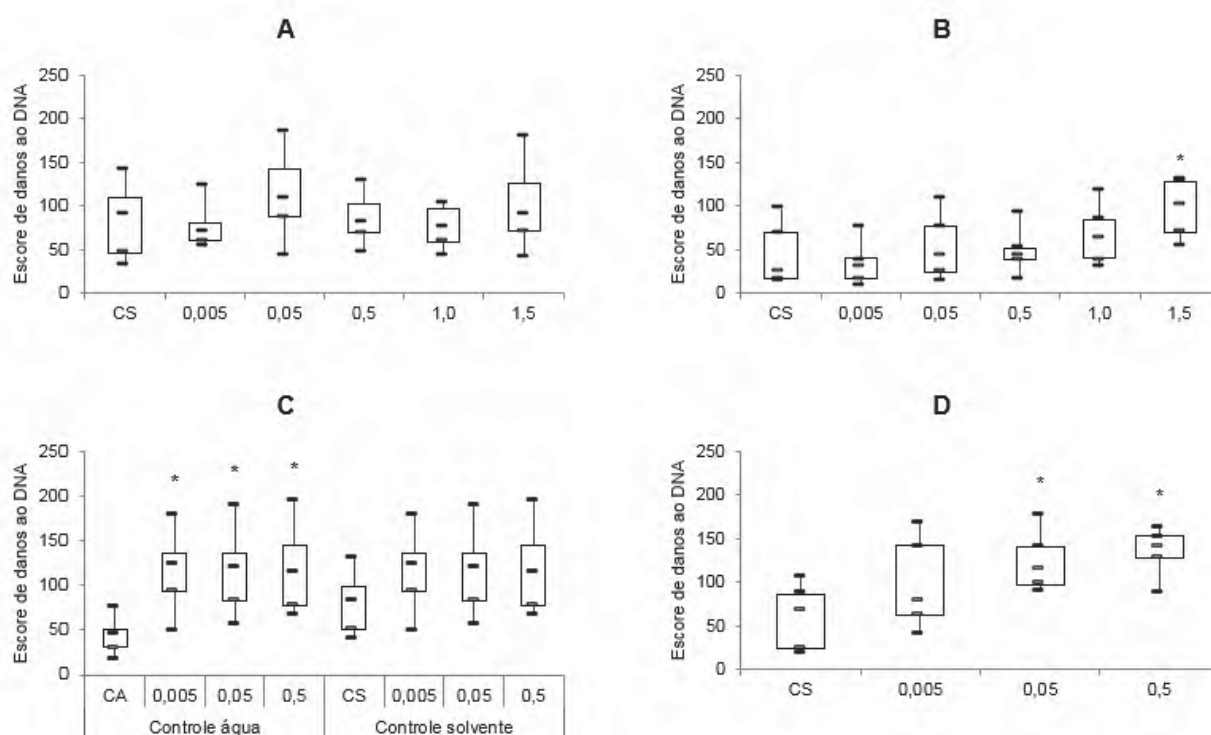


Figura 17. Escore de danos ao DNA em larvas de *A. aegypti* em exposições aguda (48 horas) e subcrônica (5 dias) a concentrações nominais de Sb (em mg.L^{-1}) e grupos controles água (CA) e solvente (CS) ($n=10$), indicando mediana, primeiro quartil, terceiro quartil, mínimo e máximo. (A) Exposição aguda em larvas de campo; (B) Exposição aguda em larvas de laboratório; (C) Exposição subcrônica em larvas de campo; (D) Exposição subcrônica em larvas de laboratório. Asteriscos representam diferença significativa entre os grupos controles água ou solvente e os tratamentos (ANOVA Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunnett; $p<0,05$).

3.4 Biomarcadores bioquímicos

A análise enzimática das duas populações, em exposição aguda a Sb, foram submetidas às seguintes concentrações: C1=0,005 mg.L⁻¹; C2=0,05 mg.L⁻¹; C3=0,5 mg.L⁻¹; C4=1,0 mg.L⁻¹ e C5=1,5 mg.L⁻¹ (Figuras 18 e 19). Em exposição subcrônica as concentrações expostas foram: C1=0,005 mg.L⁻¹; C2=0,05 mg.L⁻¹ e C3=0,5 mg.L⁻¹ (Figuras 20 e 21).

A população de campo em exposição aguda de Sb apresentaram aumento significativo na atividade da enzima AChE em todas as concentrações em relação a CA, exceto em 1,0 mg.L⁻¹, no entanto não houve diferença em nenhuma das concentrações quando comparadas a CS (Figura 18A). Houve redução da atividade de Est- α somente em 1,0 mg.L⁻¹ comparada aos grupos controles e demais concentrações (Figura 18B). Em Est- β , houve indução significativa da atividade em 0,005 mg.L⁻¹ e 0,05 mg.L⁻¹ comparado aos controles e redução em 1,0 mg.L⁻¹ comparado às demais concentrações (Figura 18C). Em GST, aumento das atividades ocorreram nas maiores concentrações (1,0 e 1,5 mg.L⁻¹) (Figura 18D). A atividade de CAT apresentou redução nas concentrações 0,005 mg.L⁻¹, 1,0 mg.L⁻¹ e 1,5 mg.L⁻¹ em relação a CS (Figura 18E). Comparados aos controles, SOD apresentou aumento da atividade em 0,005 mg.L⁻¹ (Figura 18F) e os danos de peroxidação lipídica aumentaram na concentração 0,05 mg.L⁻¹ (Figura 18G).

No ensaio agudo de Sb realizado com a população de laboratório, não houve diferença significativa na atividade enzimática de AChE (Figura 19A). Houve redução da atividade em relação aos controles na enzima Est- α nas concentrações 0,005 mg.L⁻¹ e 1,0 mg.L⁻¹ (Figura 19B), em Est- β nas concentrações 0,05 mg.L⁻¹ e 1,0 mg.L⁻¹ (Figura 19C) e em GST em 0,05 mg.L⁻¹, 0,5 mg.L⁻¹ e 1,5 mg.L⁻¹ (Figura 19D). Ocorreram aumentos significativos nas atividades enzimáticas em relação aos controles em CAT na concentração 1,0 mg.L⁻¹ (Figura 19E) e em SOD na concentração 0,005 mg.L⁻¹ (Figura 19F). Os danos de peroxidação lipídica diferiram estatisticamente entre os controles água e solvente, e as concentrações 0,005 mg.L⁻¹, 1,0 mg.L⁻¹ e 1,5 mg.L⁻¹ foram maiores quando comparados a CA e menores a CS (Figura 19G).

No ensaio subcrônico de Sb com a população de campo, as atividades de AChE e Est- β tiveram redução significativas em todas as concentrações em relação aos controles (Figuras 20A e 20C). Em Est- α , a atividade enzimática também foi menor em CS e em todas as concentrações expostas relação a CA (Figura 20B). GST apresentou redução na atividade na menor concentração (0,005 mg.L⁻¹) em relação aos controles (Figura 20D). Houve aumento das atividades em relação aos controles nas enzimas

CAT na maior concentração ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) (Figura 20E) e SOD nas concentrações $0,005 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ (Figura 20F). Os danos de LPO não variaram em relação a CS, porém, em reação a CA aumentou na menor concentração ($0,005 \text{ mg.L}^{-1}$) (Figura 20G).

A população de laboratório em exposição subcrônica ao Sb não apresentou diferença significativa em comparação aos controles nas enzimas AChE (Figura 21A) e Est- β (Figura 21C). Houve redução da atividade em relação aos controles em Est- α nas concentrações $0,005 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ (Figura 21B) e em GST nas concentrações $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ (Figura 21D). CAT apresentou aumento da atividade na maior concentração ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) em relação aos controles (Figura 21E). A atividade dos controles água e solvente em SOD foram estatisticamente diferentes entre si; na menor concentração ($0,005 \text{ mg.L}^{-1}$) ocorreu aumento em relação a CS; nos demais tratamentos ($0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) houve redução comparados a CA (Figura 21F). Houve redução dos danos de peroxidação lipídica em $0,005 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ em relação a CS, no entanto, quando comparados a CA, nenhum dos tratamentos diferiu significativamente (Figura 21G).

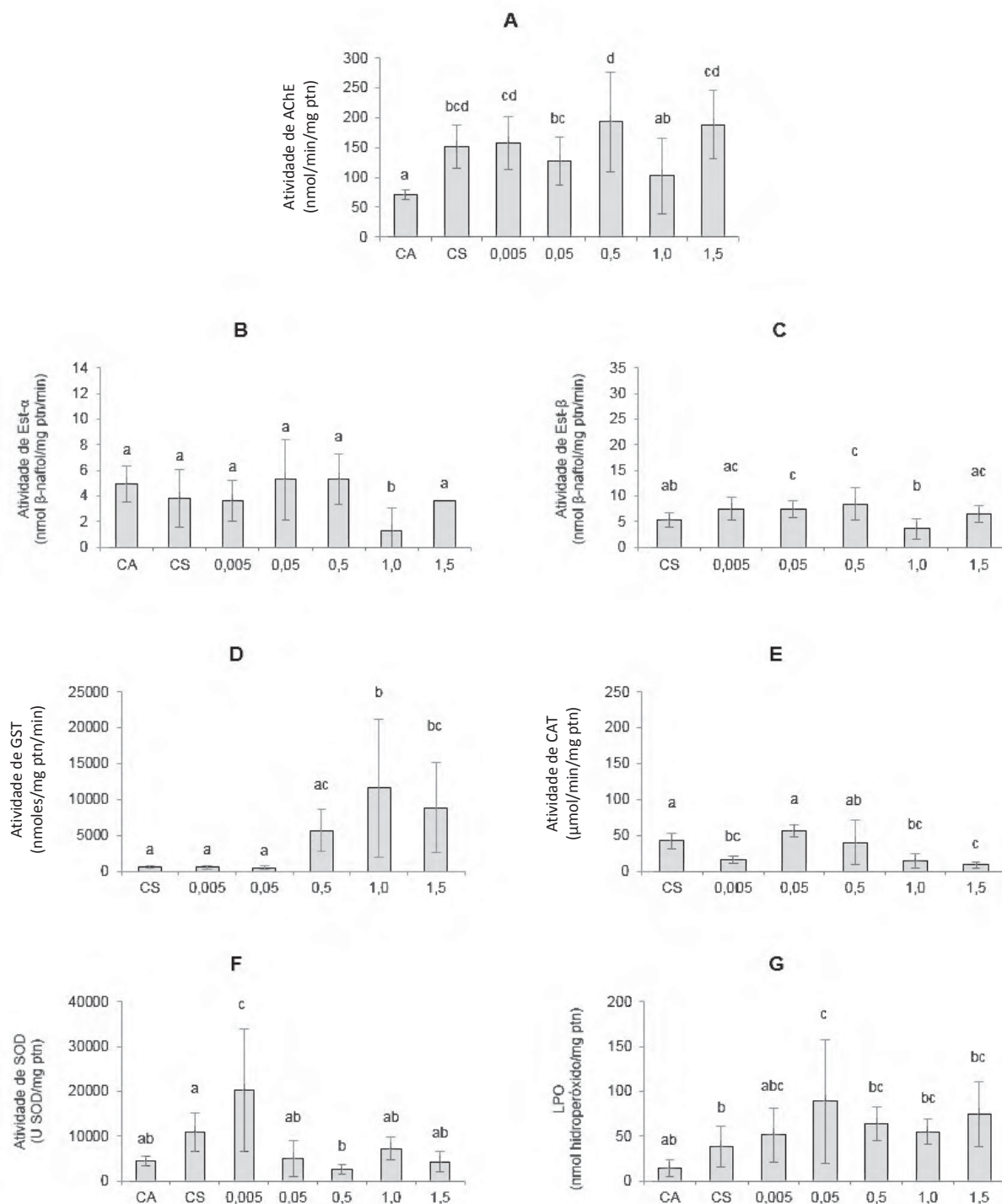


Figura 18. Média e desvio padrão da atividade das enzimas (A) AChE, (B) Est-α, (C) Est-β, (D) GST, (E) CAT, (F) SOD e (G) quantidade de hidróperóxido (LPO) em larvas de campo de *A. aegypti* após exposição aguda (48h) a concentrações de Sb e grupos controles água (CA) e solvente (CS). Letras diferentes indicam alterações significativas (ANOVA com a com pós-teste de Tukey's; $p < 0,05$).

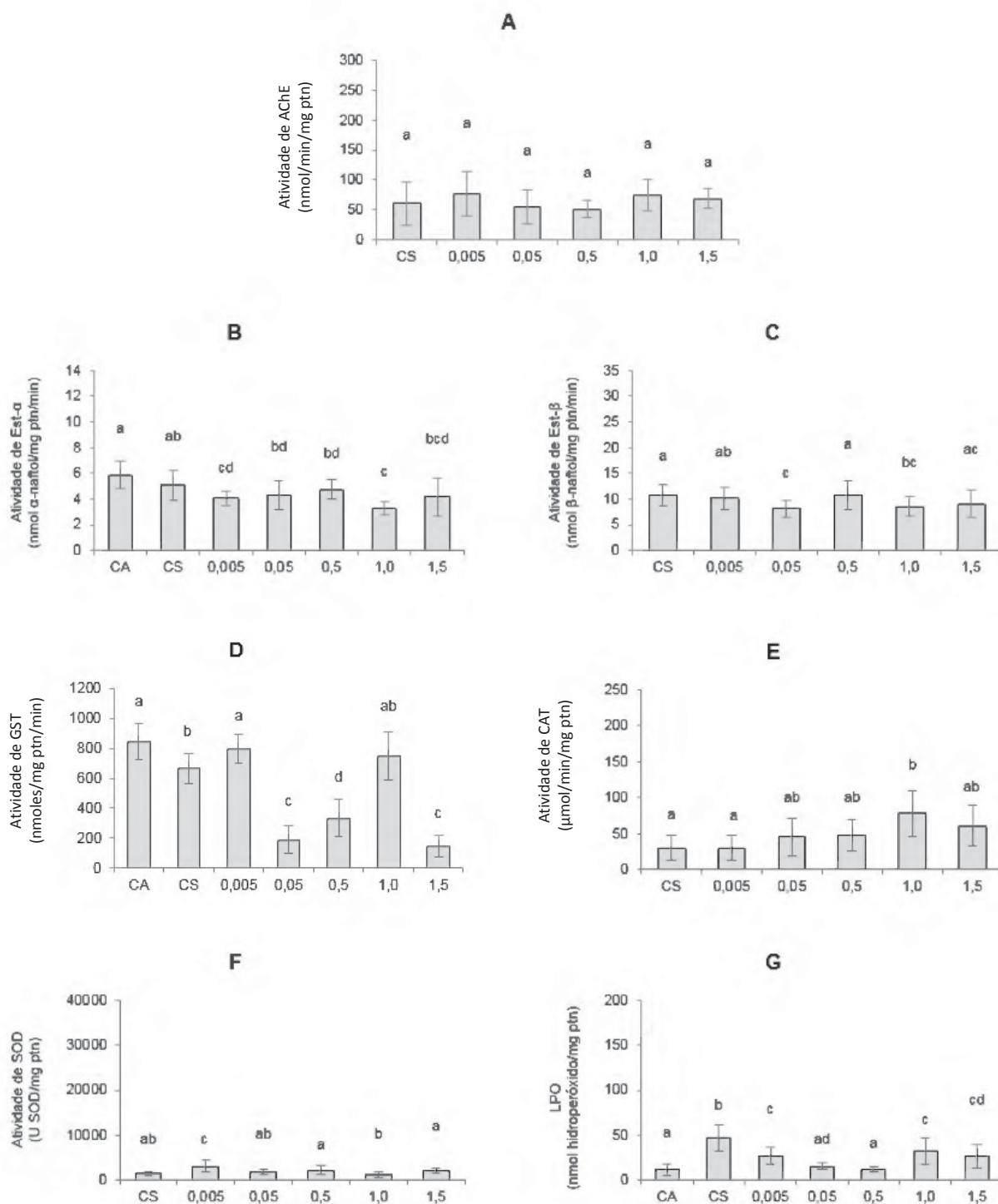


Figura 19. Média e desvio padrão da atividade das enzimas (A) AChE, (B) Est- α , (C) Est- β , (D) GST, (E) CAT, (F) SOD e (G) quantidade de hidróperóxido (LPO) em larvas de laboratório de *A. aegypti* após exposição aguda (48h) a concentrações de Sb e grupos controles água (CA) e solvente (CS). Letras diferentes indicam alterações significativas (ANOVA com pós-teste de Tukey's; $p < 0,05$).

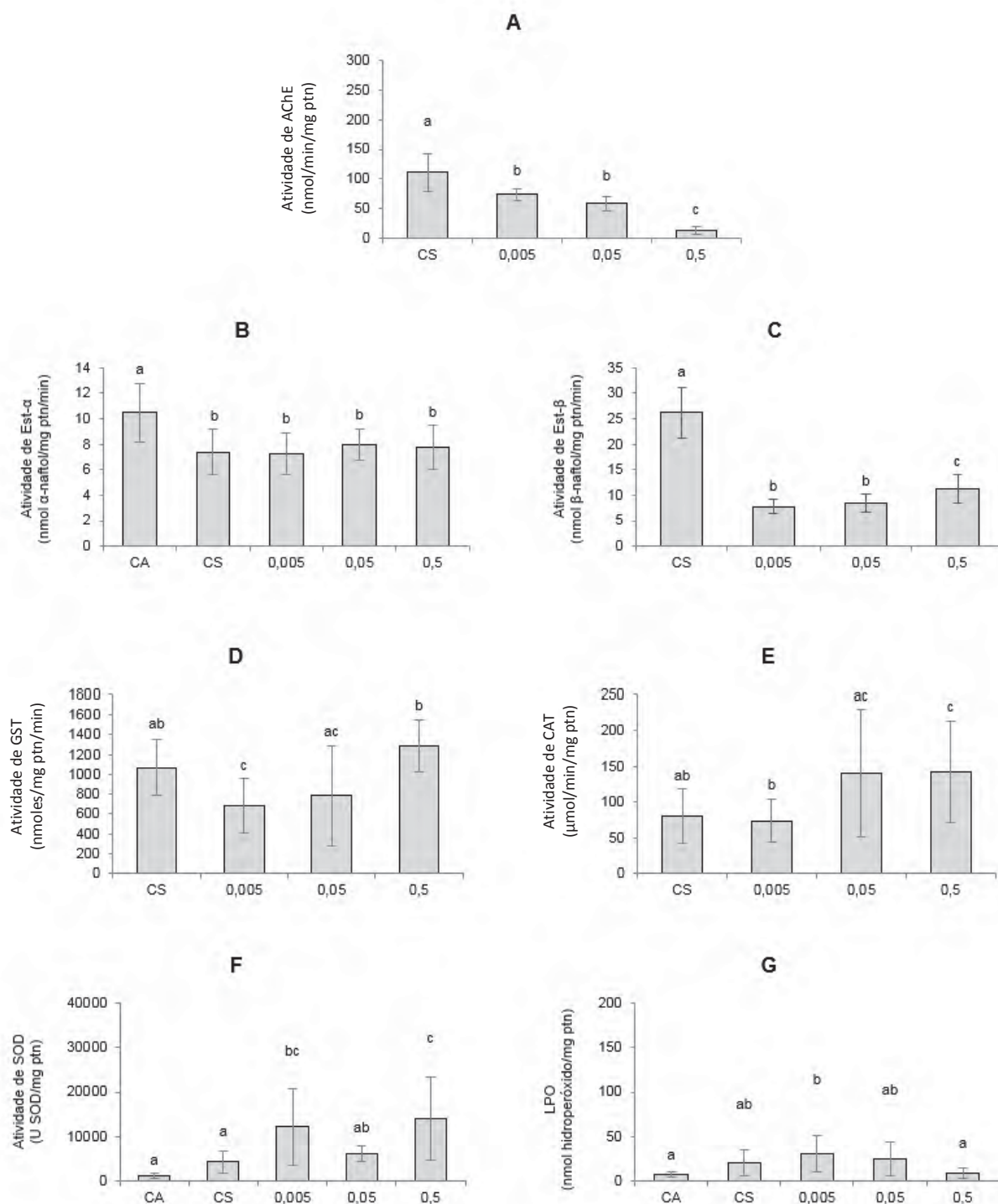


Figura 20. Média e desvio padrão da atividade das enzimas (A) AChE, (B) Est-α, (C) Est-β, (D) GST, (E) CAT, (F) SOD e (G) quantidade de hidroperóxido (LPO) em larvas de campo de *A. aegypti* após exposição subcrônica (5d) a concentrações de Sb e grupos controles água (CA) e solvente (CS). Letras diferentes indicam alterações significativas (ANOVA com *a* com pós-teste de Tukey's; $p < 0,05$).

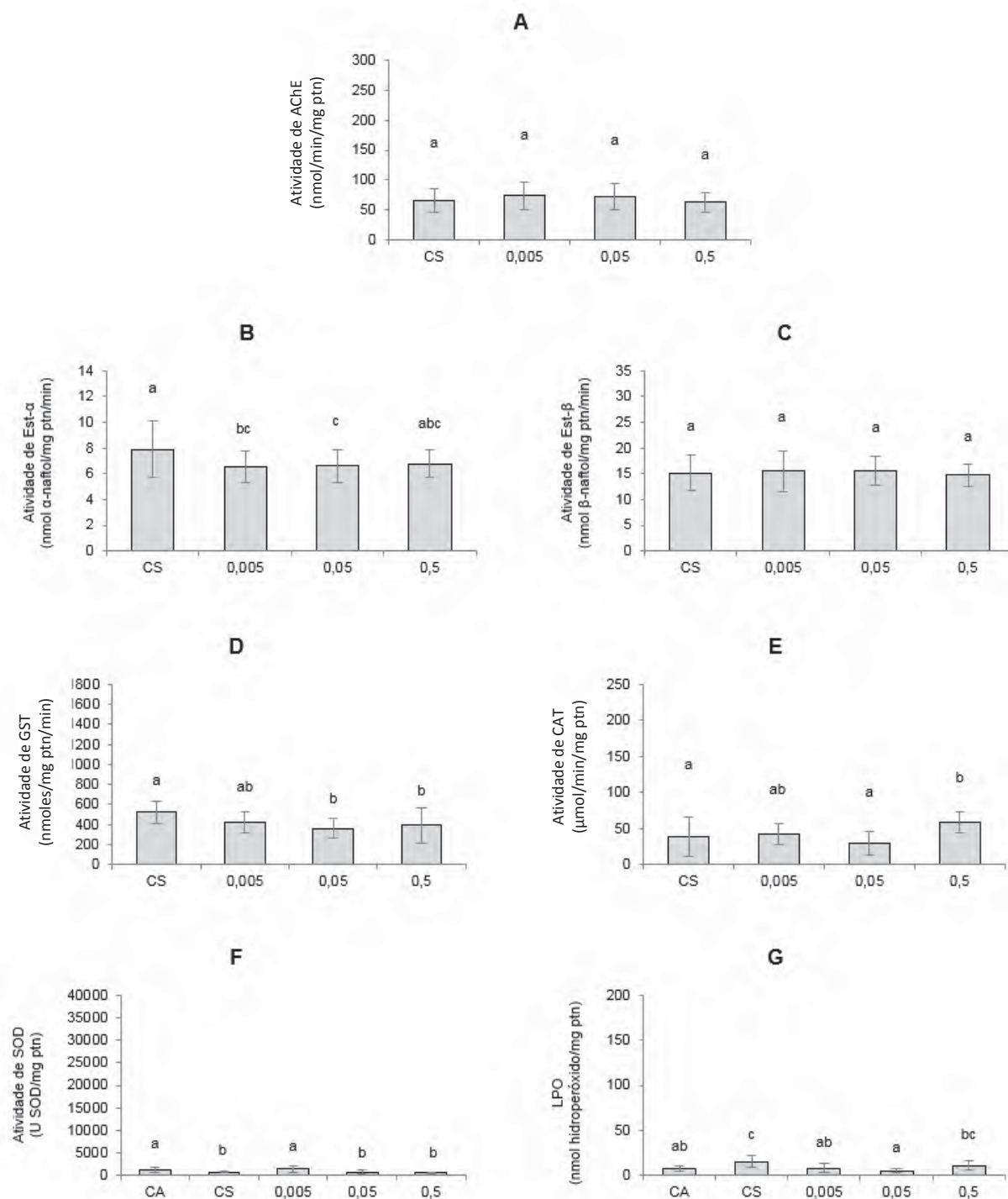


Figura 21. Média e desvio padrão da atividade das enzimas (A) AChE, (B) Est-α, (C) Est-β, (D) GST, (E) CAT, (F) SOD e (G) quantidade de hidróperóxido (LPO) em larvas de laboratório de *A. aegypti* após exposição subcrônica (5d) a concentrações de Sb e grupos controles água (CA) e solvente (CS). Letras diferentes indicam alterações significativas (ANOVA com pós-teste de Tukey's; $p < 0,05$).

3.5 Parâmetros biológicos

A sobrevivência das larvas indica o percentual médio de larvas no estágio L1 que chegaram ao estágio L4 em exposição subcrônica (cinco dias), e a emergência de adultos indica o percentual médio de larvas no estágio L4 que chegaram ao estágio adulto em exposição crônica (17 dias). Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos em nenhuma das taxas de sobrevivência, porém observamos que a maior sobrevivência das larvas na população de campo (Figura 8A) ocorreu na concentração $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ (80%) e a menor taxa de sobrevivência na maior concentração ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) (62%). A população de laboratório (Figura 8B) teve menor taxa de sobrevivência do que a de campo. Nesta, a menor taxa de sobrevivência foi no controle solvente (49%) e a maior em $0,005 \text{ mg.L}^{-1}$ (61%).

A maior taxa de emergência dos adultos foi registrada no controle água na população de campo (57%) (Figura 8A) e na maior concentração ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) na população de laboratório (55%) (Figura 8B). Em ambas as populações, a menor emergência de adultos ocorreu na concentração $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ (31% em campo e 34% em laboratório).

A média do dia de início das pupas e emergência de machos e fêmeas não apresentou significância entre os tratamentos em ambas as populações. Na população de campo (Figura 9A), as pupas iniciaram no sexto dia de ensaio crônico nos controles e na menor concentração ($0,005 \text{ mg.L}^{-1}$). A emergência de machos ocorreu antes da emergência das fêmeas em todos os controles e tratamentos. Na população de campo, em machos e fêmeas, ocorreu atraso na emergência nas maiores concentrações expostas ($0,05$ e $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$). Na população de laboratório (Figura 9B), as pupas tiveram início no quinto dia nos controles e em $0,005$ e $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$, e na maior concentração ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) ocorreu no sexto dia. Os machos iniciaram a emergência antes das fêmeas nos grupos controles e nos tratamentos, exceto no controle solvente. Nas fêmeas, houve o atraso da emergência nas maiores concentrações expostas ($0,05$ e $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) e nos machos, em CS e $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$.

O número médio de adultos emergidos por dia em ambas as populações em exposições crônicas foram variáveis entre os tratamentos, porém não tiveram diferenças significativas. Na população de campo (Figura 10A), a emergência média de adultos foi à partir do sétimo dia de exposição. O pico de emergência em todos os controles e tratamentos ocorreu no décimo dia de exposição. A emergência de adultos finalizou no 15º dia em CA e $0,005 \text{ mg.L}^{-1}$, e no 16º dia em CS e nos demais tratamentos. Na população de laboratório (Figura 10B), o pico de emergência ocorreu no 13º dia de exposição em CA, $0,005 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$, e 15º dia em CS e na maior concentração

(0,5 mg.L⁻¹). Em todos os controles e tratamentos, os últimos adultos emergiram no 17º dia de exposição, exceto em 0,005 mg.L⁻¹ que finalizou no dia 16.

O número de machos e fêmeas que emergiram em todos os controles e tratamentos em ambas as populações não apresentaram diferença significativa (Tabela VII). No entanto, na população de campo, em CA, 0,005 mg.L⁻¹ e 0,05 mg.L⁻¹ a razão sexual foi de 1:1, e em CS e 0,5 mg.L⁻¹ houve maior emergência de fêmeas (55% e 66%, respectivamente). Na população de laboratório, a emergência de fêmeas foi maior em todos os tratamentos e controles, sendo maiores nas concentrações 0,005 mg.L⁻¹ e 0,05 mg.L⁻¹ (74% e 76%, respectivamente).

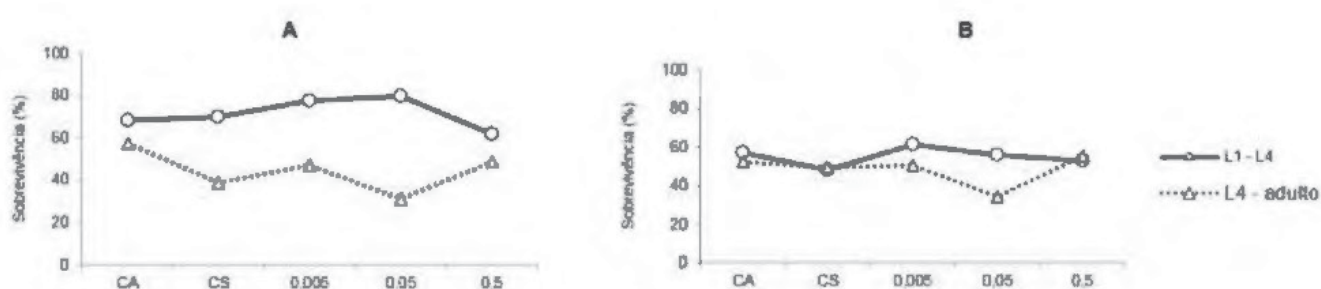


Figura 22. Percentual médio de sobrevivência de larvas e emergência de adultos de *A. aegypti* em exposição a concentrações nominais de Sb (em mg.L⁻¹) e grupos controles água (CA) e solvente (CS). (A) Larvas de campo; (B) Larvas de laboratório; (-○-) Taxa de desenvolvimento de larvas L1 a L4 em exposição subcrônica; (-△-) Taxa de desenvolvimento de larvas L4 a adultos em exposição crônica (ANOVA Kruskal-Wallis com pós-teste de Tukey's; p<0,05).

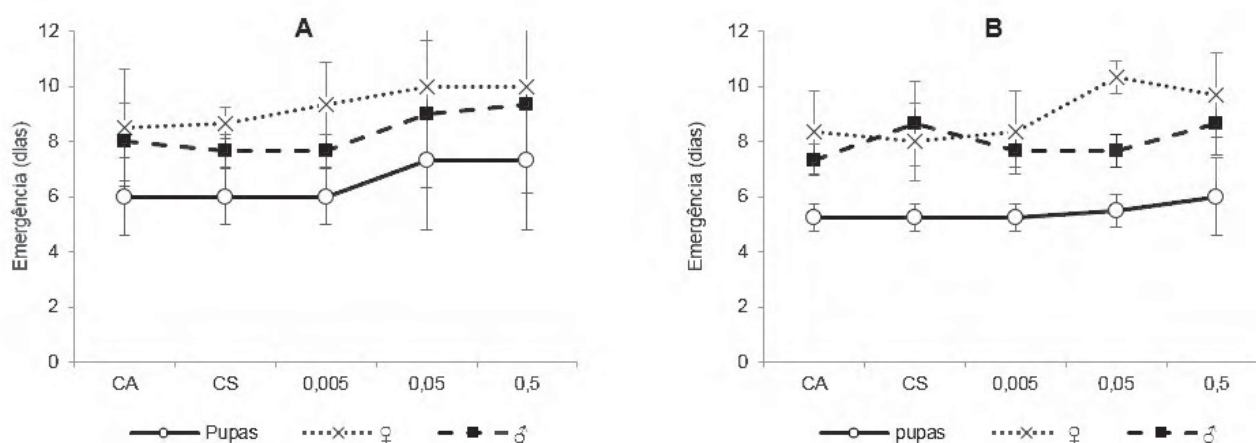


Figura 23. Média e desvio padrão do início da emergência (em dias) de pupas e adultos machos e fêmeas de *A. aegypti* após exposição crônica (15 dias) a concentrações nominais de Sb (em mg.L⁻¹) e grupos controles água (CA) e solvente (CS). (A) Exposição crônica em amostras de campo; (B) Exposição crônica em amostras de laboratório.

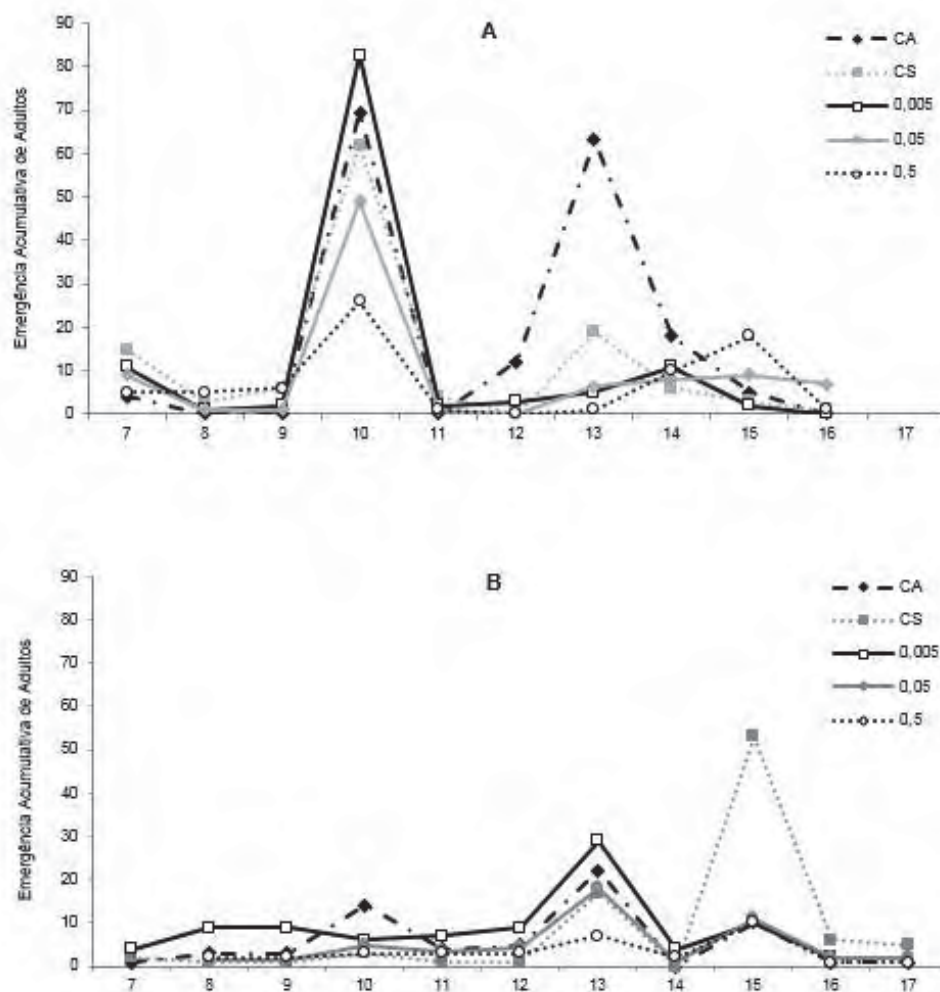


Figura 24. Média e desvio padrão da emergência (em dias) de adultos de *A. aegypti* após exposição crônica (15 dias) a concentrações nominais de Sb (em mg.L⁻¹) e grupos controles água (CA) e solvente (CS). (A) Exposição crônica em amostras de campo; (B) Exposição crônica em amostras de laboratório.

Tabela VII. Percentual médio de machos e fêmeas emergidos e razão sexual das populações de campo e de laboratório de *A. aegypti* após exposição crônica (15 dias) a concentrações nominais de Sb (em mg.L⁻¹) e grupos controles água (CA) e solvente (CS). O símbolo (-) indica ausência de diferenças significativas (Qui-quadrado; $p < 0,05$).

	Campo				Laboratório			
	♂	♀	Razão sexual	χ^2	♂	♀	Razão sexual	χ^2
CA	49.7	50.3	1:1	-	45.1	54.9	0,82:1	-
CS	45.3	54.7	0,83:1	-	30.5	69.5	0,44:1	-
0,005	51.1	48.9	1,04:1	-	25.8	74.2	0,35:1	-
0,05	51.8	48.2	1,07:1	-	24.2	75.8	0,32:1	-
0,5	34.3	65.7	0,52:1	-	44.0	56.0	0,79:1	-

4. DISCUSSÃO

Por todo o mundo, compostos com diferentes concentrações de antimônio tem potencial de impactar a qualidade da água e ser nocivo aos ecossistemas aquáticos (XI; HE; WANG, 2013). E apesar de ser um contaminante prioritário, o conhecimento sobre a mobilidade e absorção biológica do antimônio em diferentes condições ambientais ainda é escasso (FU et al., 2016; WARNKEN et al., 2017). Por esta razão, e por existir um número maior de trabalhos com arsênio, tem sido comum estender para antimônio o conhecimento adquirido com este metal. Ambos são elementos do grupo V, quimicamente semelhantes e, portanto, possuem comportamento geoquímico e toxicidade comparáveis (FU et al., 2016).

O antimônio, juntamente com seus compostos, é classificado como resíduo perigoso e o limite máximo para a presença de compostos de antimônio em água doce no Brasil, é de $0,005 \text{ mg.L}^{-1}$ (CONAMA, 2005). No entanto, as concentrações reais encontradas na natureza podem ser bem maiores (ZENG et al., 2015; FU et al., 2016; PIERART et al., 2018). Diante disto, submetemos larvas de populações naturais e de laboratório de *A. aegypti* a diferentes concentrações nominais de Sb que são possíveis de serem encontradas no ambiente aquático (de $0,005 \text{ mg.L}^{-1}$ a $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$), sendo possível fornecer novas contribuições sobre efeito genotóxico, bioquímico e biológico do metaloide antimônio em mosquitos.

No presente estudo, na análise da quantificação do antimônio na água não foram encontrados traços deste nos controles água e solvente. Em todos os tratamentos no ensaio agudo e na menor concentração no ensaio crônico não houve diferença entre as concentrações nominais e as reais iniciais em ambas as populações. Nas duas maiores concentrações no ensaio crônico, os valores reais disponíveis foram menores do que o estimado. Nos ensaios agudos de ambas as populações ocorreu aumento da concentração ao final das 48h, o que pode ser explicado pela proliferação bacteriana na água, pois de acordo com estudos, algumas bactérias possuem alta versatilidade na transformação de íons metaloides (MEYER et al., 2007; YUAN et al., 2008).

Embora o ensaio crônico tenha sido feito em câmeras de germinação com os parâmetros controlados, utilizada aeração constante e a água tenha sido substituída no sétimo dia, ainda ocorreu a proliferação de algas e fungos no aquário, além da provável proliferação de bactérias. Estes, segundo estudos, ocasionam o acúmulo de metaloides na água, explicando os maiores valores para as concentrações reais ao final dos 17 dias de exposição nas duas menores concentrações (THOMSON; MAHER; FOSTER, 2007; BILAL et al., 2018). Já na maior concentração exposta, houve redução no final da exposição, possivelmente porque após um longo período, o antimônio pode acumular-

se nos tecidos vascularizados dos organismos, deixando o metaloide menos disponível no ambiente (GEBEL, 1997).

A mortalidade das larvas de quarto instar nas populações de campo e laboratório em exposição aguda foi concentração dependente, sendo as maiores concentrações as que apresentaram maior taxa de mortalidade. Porém, mesmo na maior concentração exposta, a mortalidade não passou de 22%. Sendo assim, observamos que o antimônio teve baixo efeito tóxico sobre as larvas de *A. aegypti* nas concentrações analisadas. Mogren et al. (2014) avaliaram diversos estudos de toxicidade e afirmaram que, apesar da mortalidade aguda ser geralmente utilizada como *endpoint*, é necessário levar em consideração os processos biológicos e ecológicos que podem ser interrompidos e/ou alterados em exposição a concentrações subletais, sendo indispensável a utilização de técnicas complementares para a melhor avaliação da toxicidade dos compostos.

Em exposição a metais e metaloides, os organismos vivos geralmente utilizam estratégias para auxiliar a sobrevivência, como a formação de barreira física para a redução da absorção, eliminação através de urina ou fezes e a desintoxicação através de proteínas e enzimas (LEONARD et al., 2009; PEREZ; NORIEGA, 2014). Sendo assim, analisamos o papel metabólico das enzimas acetilcolinesterase, esterases α e β , glutathione S-transferase, superóxido dismutase e catalase, além da avaliação da peroxidação lipídica.

A atividade enzimática de AChE não demonstrou efeito neurotóxico do antimônio em ambos os tempos de exposição na população de laboratório e em exposição aguda na população de campo, pois não houve diferença significativa entre os controles e os tratamentos. Somente na população de campo em exposição subcrônica houve a inibição da atividade, sugerindo o efeito neurotóxico do composto neste ensaio, já que a AChE é responsável pela regulação do impulso nervoso e sua redução pode resultar na desregulação da função do sistema nervoso, podendo provocar paralisia e morte (CUNHA et al., 2007; PANG et al., 2012)

Ainda assim, a AChE não se mostrou como bom marcador de toxicidade a antimônio, sendo raros os trabalhos relacionando Sb, e até mesmo arsênio, à ação desta enzima em invertebrados. Em tese não publicada, Moraes (2018) observou resposta diferente em larvas de *C. sancticaroli* expostas a 0,8 mg.L⁻¹ de Sb, em que ocorreu aumento da atividade de AChE, sugerindo resposta ao estresse oxidativo. Foi encontrado apenas um trabalho em invertebrados que identifica o arsênio como inibidor de AChE, com o crustáceo *Tigriopus brevicornis* (Müller, 1776) (FORGET et al., 1999).

Os resultados obtidos nas enzimas EST- α , EST- β e GST demonstraram a direta relação entre as enzimas de biotransformação de fases I e II, pois ocorreu o mesmo padrão de atividade nas três enzimas. Na população de campo em exposição aguda,

houve redução das atividades apenas na concentração 1,0 mg.L⁻¹ em comparação aos controles e demais concentrações, enquanto na exposição subcrônica na população de campo e em ambos os tempos de exposições na população de laboratório, as atividades sofreram redução. Sendo assim, apenas na concentração em que houve a indução das atividades foi possível observar a ação tóxica do Sb, ativando as enzimas de biotransformação. Nos demais tratamentos, populações e tempos de exposição, não foi observada toxicidade.

Poupardin et al. (2008) destacaram a GST como um dos importantes mecanismos antioxidantes que permitem que os insetos sobrevivam em um ambiente contaminado e Hyne e Maher (2003) afirmaram que é o principal biomarcador de exposição utilizado para avaliar a função biológica prejudicada por metaloides em tecidos vivos. Diante disso, destacamos à partir dos dados encontrados que as esterases e a GST não foram eficazes como biomarcadores de toxicidade para antimônio.

Os metais e metaloides, de acordo com estudos realizados com insetos, são capazes de interagir com o DNA e de produzir espécies reativas de oxigênio, que levam à destruição oxidativa de componentes celulares, a danos ao DNA, às proteínas e às estruturas das células, como lipídios e membranas, que geram estresse oxidativo e causam a inativação de enzimas, mutações e morte celular (POUPARDIN et al., 2008; FLORA, 2009; NIKOLIĆ et al., 2015; MURUGAN et al., 2016). Os efeitos nocivos das EROs provocam a ação de enzimas antioxidantes, como CAT e SOD, que protegem o organismo contra a toxicidade de metais e metaloides. Estas enzimas estão diretamente ligadas, pois a SOD catalisa a dismutação de radicais superóxidos produzindo H₂O₂, utilizado como substrato para CAT (MATHIEU-DENONCOURT et al., 2015; NIKOLIĆ et al., 2015). Sendo assim, de forma geral, os resultados obtidos para SOD e CAT evidenciaram alterações na via de defesa ao estresse oxidativo provocadas pela ação do Sb, pois ocorreu aumento na atividade destas enzimas em ambas as populações e tempos de exposição. Concomitantemente, ocorreu o aumento da peroxidase (LPO), corroborando os efeitos deletérios que as EROs podem provocar na membrana celular.

O ensaio cometa alcalino em exposição aguda não demonstrou aumento de danos ao DNA na população de campo. Na população de laboratório houve aumento significativo apenas na maior concentração. Em exposição subcrônica, os danos aumentaram em relação aos controles nas duas populações, demonstrando os efeitos genotóxicos ocasionados pela presença do antimônio. Resultados similares foram encontrados por Oberholster et al. (2011) que relataram aumento dos níveis de CAT, LPO e dos danos ao DNA em *C. tentans* expostos a 5 µg.kg⁻¹ de Sb₅O₂ por 48 horas.

De acordo com Jha (2008), para ser considerado uma boa ferramenta ecotoxicológica, o ensaio cometa deve mostrar correlações com outras respostas biológicas, pois como os danos tendem a ser maiores com o aumento do tempo de exposição, podem ocorrer enfraquecimento dos processos de plasticidade fisiológicos, homeostáticos ou fenotípicos normais. Oberholster et al. (2011) complementaram sugerindo que os efeitos genotóxicos podem causar distúrbios hereditários a longo prazo, afetando a estrutura genética da população no ambiente aquático.

A quantidade de mosquitos que chegaram à fase adulta na população de campo foi menor do que o número de larvas L1 expostas ao composto, sendo possível observar redução na quantidade de larvas L4 que sofreram a metamorfose para as fases de pupa e adulto. Na população de laboratório, nos controles e na maior concentração, as larvas que atingiram o quarto instar também chegaram ao estágio de adulto.

As taxas de sobrevivência das larvas no estágio L1 que chegaram ao estágio L4 (exposição subcrônica) na população de campo foi superior a 60% em todos os tratamentos e controles. Na maior concentração detectamos maior mortalidade de larvas. A população de laboratório teve taxa de sobrevivência menor do que a de campo. Nessa, a menor taxa de sobrevivência foi no controle solvente, e entre os tratamentos também foi na maior concentração.

Na população de campo, a metamorfose para o estágio de pupa e a emergência de adultos ocorreram primeiramente nos grupos controles e na menor concentração, e depois nas maiores concentrações. As fêmeas iniciaram a emergência após os machos. O maior número de adultos emergidos foi na menor concentração e no 10º dia em todos os controles e tratamentos. O ciclo de vida teve duração mais curta no controle água (15 dias) e até o 16º dia nos demais. A razão sexual foi de 1:1 no controle água e nas duas menores concentrações, enquanto no controle solvente e na maior concentração ocorreu maior emergência de fêmeas.

Na população de laboratório, a média do dia de início das pupas ocorreu antes do que na população de campo, sendo anteriores nos controles e na menor concentração, e ocorrendo depois na concentração mais alta. Os machos iniciaram a emergência antes das fêmeas, com exceção do controle solvente, em que houve o atraso da emergência. As fêmeas emergiram antes nos grupos controles e na menor concentração, havendo atraso nas concentrações mais altas. No controle solvente e na maior concentração, a razão sexual foi positiva para os machos, enquanto nos demais tratamentos, houve maior incidência de fêmeas. A porcentagem de emergência dos adultos ocorreu à partir do sétimo dia de exposição, e a maior taxa de emergência foi no dia 13 no controle solvente e menores concentrações e no dia 15 nos demais. O

tempo máximo de desenvolvimento foi de 17 dias nos controles e tratamentos, exceto na menor concentração que os adultos emergiram até o 16º dia.

O aumento da proporção de fêmeas em ambas as populações é preocupante, pois como as fêmeas são responsáveis pela transmissão de agentes etiológicos de doenças, pode acarretar em aumento da dispersão e capacidade vetorial (PRUD'HOMME et al., 2017). De acordo com Zeller e Koella (2016), em temperatura ideal de 25°C e com alto fornecimento de alimento, os mosquitos levavam 10 dias para atingir o estágio adulto. Os dados mostraram que o maior número de adultos emergidos foi anterior na população de campo, no décimo dia, enquanto na população de laboratório foi possível observar o atraso no desenvolvimento nas fêmeas e a emergência anterior dos machos. Em estudo realizado com *C. tentans* em exposição a Sb_2O_5 foi observada redução na taxa de crescimento, o que fez com que os organismos amadurecessem em tamanhos menores e minimizasse sua capacidade de reprodução (OBERHOLSTER et al., 2011). Mogren et al., (2012) verificaram diferença nos dias de emergência de machos e fêmeas de *C. riparius* (Meigen, 1804) em exposição a arsênio V, havendo atraso nas fêmeas.

Diversos trabalhos foram realizados a fim de analisar os efeitos biológicos em mosquitos expostos a diferentes metais. Em *A. aegypti*, a exposição ao cobre provocou redução na massa corporal de adultos, causando comprometimento no desenvolvimento e no desempenho de larvas e adultos (PEREZ; NORIEGA, 2014) e aumento na taxa de mortalidade provocadas pela exposição aguda a cádmio, mercúrio e cobre (RAYMS-KELLER et al., 1998); após exposição a cádmio, cobre e chumbo, em *Culex pipiens* houve aumento da mortalidade, redução na fecundidade das fêmeas e na eclosão de ovos (EL-SHEIKH et al., 2010) e em *Anopheles gambiae*, foram relatados aumento da tolerância aos metais entre a primeira e a terceira geração após exposição dos imaturos, com redução da viabilidade dos ovos, sobrevivência de larvas e pupas, emergência dos adultos, fecundidade e taxa de reprodução (MIREJI et al., 2006, 2011).

Não foi avaliado em nosso trabalho o acúmulo do antimônio no organismo do mosquito, porém, sabe-se que os dípteros produzem estruturas nos túbulos de Malpighi capazes de sequestrar metais e metaloides como uma forma de aumentar sua tolerância a tóxicos (GILLIS; WOOD, 2008; LEONARD et al., 2009). Como as larvas dos mosquitos não possuem tecidos respiratórios em contato direto com o meio aquático, outros tecidos são os canais de interação com as toxinas, como as papilas anais das larvas, implicadas na regulação iônica, osmorregulação e remoção de resíduos nitrogenados e o canal alimentar, responsável pela digestão, osmorregulação e absorção de nutrientes (AKHTER et al., 2017).

Embora a exposição diretamente na água seja uma forma de acúmulo de metaloides no organismo, Lopez et al. (2016) fizeram uma análise de diversos trabalhos com exposição a arsênio e concluíram que o acúmulo pelos organismos na base da cadeia alimentar pode ter implicações importantes para a transferência trófica, e as concentrações teciduais de arsênio (As) nos animais consumidores estão mais correlacionadas com a concentração em seus alimentos do que com a água. Mogren et al. (2013) avaliaram que o arsênio possui potencial de transferência trófica entre insetos. *Culex tarsalis* (Coquilett, 1896) foi exposto por todo o ciclo de vida a $0,001 \text{ mg.L}^{-1}$ de arsênio, e serviu de alimento para o louva-deus *Tenodera aridifolia sinensis* (Saussure, 1871), a aranha *Tidarren haemorrhoidale* (Bertkau, 1880) e o hemíptero *Buenoa scimitra* Bare, 1925, sendo possível observar o acúmulo do As em todas as espécies envolvidas no trabalho.

Duran et al. (2007) encontraram acúmulo da concentração total de antimônio no organismo do tricóptero *Hydropsyche pellucidula* (Curtis, 1834) e da libélula *Leucorrhinia dubia* (Vander Linden, 1825) coletados em mina de antimônio em comparação aos coletados em locais sem exposição e reportaram maior quantidade dos animais em locais com a contaminação, sugerindo o desenvolvimento de resistência à contaminação por antimônio e a diminuição da competição interespecífica, propiciando a abundância populacional. Alguns organismos conseguem sobreviver em ambientes contaminados mesmo a altas exposições dos poluentes por meio da metabolização e detoxificação dos mesmos, podendo provocar alterações genéticas que permitem a adaptação, ou podem resistir a baixas concentrações por mecanismos homeostáticos normais, podendo manter as funções normais sem custo metabólico (SARKAR; DUTTAGUPTA; MAL, 2004; PEREZ; NORIEGA, 2014).

As diferentes respostas obtidas entre as populações de campo e de laboratório possivelmente ocorreram porque em populações criadas durante muitos anos em laboratório ocorre isolamento reprodutivo e aumento da homozigosidade, gerando consequências como redução do valor adaptativo, passíveis de afetar o desenvolvimento do inseto (POWELL; EVANS, 2017; ROSS; ENDERSBY-HARSHMAN; HOFFMANN, 2017), aliado ao fato de que as populações provenientes da natureza já entraram em contato previamente com metais, tendo seus sistemas metabólicos desafiados às condições físico-químicas do nicho ecológico que habitavam (HERRERO et al., 2014). Sendo assim, os dados obtidos demonstram o efeito tóxico do antimônio sob as larvas de *A. aegypti*, provocando consequências nos níveis molecular, bioquímico e populacional.

5. CONCLUSÃO

Os dados de mortalidade em exposição aguda mostraram baixa toxicidade do antimônio sobre as larvas de *A. aegypti* em exposição aguda e alta toxicidade em maior período de exposição.

A quantificação das concentrações de antimônio demonstrou efeitos tóxicos em concentrações iguais ou abaixo do limite de 0,005 mg.L estabelecido pela resolução do CONAMA (2005).

O antimônio não alterou a atividade da acetilcolinesterase, não mostrando efeito neurotóxico nas larvas. Demonstrou causar efeitos no metabolismo de *A. aegypti* ao ativar a ação das enzimas de biotransformação apenas em exposição aguda na população de campo, não havendo efeitos em exposição subcrônica. Foram evidenciadas alterações na via de defesa ao estresse oxidativo em ambas as populações e tempos de exposição. E os danos ao DNA foram induzidos na população de laboratório na maior concentração em exposição aguda e nas duas populações em exposição subcrônica.

Nos dados obtidos sobre os parâmetros biológicos, resultados mais prejudiciais foram observados na população de laboratório em comparação à população de campo, com destaque para a redução da mortalidade durante o desenvolvimento, o atraso no estágio de pupa e emergência de adultos e maior proporção de emergência de fêmeas, fatores que podem alterar positivamente a transmissão de agentes etiológico do vetor *A. aegypti*.

REFERÊNCIAS

- AKHTER, H.; MISYURA, L.; BUI, P.; DONINI, A. Salinity responsive aquaporins in the anal papillae of the larval mosquito, *Aedes aegypti*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 203, p. 144–151, 2017. DOI. 10.1016/j.cbpa.2016.09.008.
- ANDERSON, C. G. The metallurgy of antimony. **Chemie der Erde**, v. 72, n. 4, p. 3–8, jul. 2012. DOI. 10.1016/j.chemer.2012.04.001.
- AZQUETA, A.; GUTZKOW, K. B.; BRUNBORG, G.; COLLINS, A. R. Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 724, n. 1–2, p. 41–45, 2011. DOI. 10.1016/j.mrgentox.2011.05.010.
- BEYERSMANN, D.; HARTWIG, A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. **Archives of Toxicology**, v. 82, n. 8, p. 493–512, ago. 2008. DOI. 10.1007/s00204-008-0313-y.
- BILAL, M.; RASHEED, T.; SOSA-HERNÁNDEZ, J. E.; RAZA, A.; NABEEL, F.; IQBAL, H. M. N. Biosorption: An interplay between marine algae and potentially toxic elements - A review. **Marine Drugs**, v. 16, n. 2, p. 1–16, 2018. DOI. 10.3390/md16020065.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248–254, maio 1976. DOI. 10.1006/abio.1976.9999.
- COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 249–261, 2004. DOI. 10.1385/MB:26:3:249.
- CONAMA. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**.
- CONAMA. **Resolução nº 452, de 02 de julho de 2012**.
- COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008. DOI. 10.1590/s0100-40422008000700038.
- CUNHA, I.; MANGAS-RAMIREZ, E.; GUILHERMINO, L. Effects of copper and cadmium on cholinesterase and glutathione S-transferase activities of two marine gastropods (*Monodonta lineata* and *Nucella lapillus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 145, n. 4, p. 648–657, 2007. DOI. 10.1016/j.cbpc.2007.02.014.
- DIZER, H.; SILVA-DE-ASSIS, H. C.; HANSEN, P. D. Cholinesterase activity as a bioindicator for monitoring marine pollution in the Baltic Sea and the Mediterranean Sea. In: **Biomarkers in Marine Organisms: a practical approach**. p. 331–342.
- DURAN, M.; KARA, Y.; AKYILDIZ, G. K.; OZDEMIR, A. Antimony and heavy metals accumulation in some macroinvertebrates in the Yesilirmak River (N Turkey) near the Sb-mining area. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 78, n. 5, p. 395–399, 2007. DOI. 10.1007/s00128-007-9183-x.
- EL-SHEIKH, T. M. Y.; FOUDA, M. A.; HASSAN, M. I.; ABD-ELGHAPHAR, A.-E. A.; HASABALLAH, A. I. Toxicological Effects of Some Heavy Metal Ions on *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). **Egyptian Academic Journal of Biological Science**, v. 2, n. 1,

p. 63–76, 2010. DOI. 10.21608/eajbsf.2010.17465.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES JR, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 1, p. 88–95, 1961. DOI. 10.1016/0006-2952(61)90145-9.

FERREIRA, S. L. C.; SANTOS, W. N. L.; SANTOS, I. F.; JUNIOR, M. M. S.; SILVA, L. O. B.; BARBOSA, U. A.; SANTANA, F. A.; QUEIROZ, A. F. S. Strategies of sample preparation for speciation analysis of inorganic antimony using hydride generation atomic spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 114, n. 1, p. 22–31, 2014. DOI. 10.1016/j.microc.2013.11.019.

FLORA, S. J. S. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, n. 4, p. 191–206, 2009. DOI. 10.4161/oxim.2.4.9112.

FORGET, J.; PAVILLON, J.-F.; BELIAEFF, B.; BOCQUENÉ, G. Joint action of pollutant combinations (pesticides and metals) on survival (LC50 values) and acetylcholinesterase activity of *Tigriopus brevicornis* (Copepoda, Harpacticoida). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 5, p. 912–918, 1999. DOI. 10.1002/etc.5620180514.

FU, Z.; WU, F.; MO, C.; DENG, Q.; MENG, W.; GIESY, J. P. Comparison of arsenic and antimony biogeochemical behavior in water, soil and tailings from Xikuangshan, China. **Science of the Total Environment**, v. 539, p. 97–104, 2016. DOI. 10.1016/j.scitotenv.2015.08.146.

GAO, R.; YUAN, Z.; ZHAO, Z.; GAO, X. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 45, n. 1, p. 41–45, 1998. DOI. 10.1016/s0302-4598(98)00072-5.

GEBEL, T. Arsenic and antimony: comparative approach on mechanistic toxicology. **Chemico-Biological Interactions**, v. 107, n. 3, p. 131–144, nov. 1997. DOI. 10.1016/S0009-2797(97)00087-2.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 695–706, 2007.

GILLIS, P. L.; WOOD, C. M. The effect of extreme waterborne cadmium exposure on the internal concentrations of cadmium, calcium, and sodium in *Chironomus riparius* larvae. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, n. 1, p. 56–64, 2008. DOI. 10.1016/j.ecoenv.2007.08.003.

GOMES, A. D. C. Medidas dos níveis de infestação urbana para *Aedes (Stegomyia) aegypti* e *Aedes (stegomyia) albopictus* em Programa de Vigilância Entomológica. **Informe Epidemiológico do Sus (IESUS)**, v. 7, n. 3, p. 49–57, set. 1998. DOI. 10.5123/S0104-16731998000300006.

GOMES, A. dos S.; SCIAVICO, C. J. de S.; EIRAS, Á. E. Periodicidade de oviposição de fêmeas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) em laboratório e campo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 4, p. 327–332, 2006. DOI. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822006000400002>.

HEMINGWAY, J. (ed.). **Techniques to detect insecticide resistance mechanisms (field and laboratory manual)**. World Health Organization, 1998. v. 6

HERRERO, Ó.; PLANELLÓ, R.; AQUILINO, M.; MORCILLO, G. Evaluación de los efectos tóxicos de ftalatos sobre poblaciones naturales de *Chironomus riparius*

(Diptera): implicaciones en estudios de ecotoxicidad. **Revista de Toxicología**, v. 31, n. 2, p. 176–186, 2014.

HUGO AEBI. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. 1947, p. 121–126, 1984. DOI. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).

HYNE, R. V.; MAHER, W. A. Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 54, n. 3, p. 366–374, mar. 2003. DOI. 10.1016/S0147-6513(02)00119-7.

JHA, A. N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 207–221, 2008. DOI. 10.1093/mutage/gen014.

JIANG, Z.-Y.; HUNT, J. V.; WOLFF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, v. 202, n. 2, p. 384–389, 1992. DOI. 10.1016/0003-2697(92)90122-n.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T.; HAYASHY, M.; SOFUNY, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **Mammalian Mutagenicity**, v. 3, n. 1, p. 103–105, jan. 1995.

LEE, S.-B.; CHOI, J. Multilevel evaluation of nonylphenol toxicity in fourth-instar larvae of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 11, p. 3006–3014, 2006. DOI. 10.1897/05-601r1.1.

LEONARD, E. M.; PIERCE, L. M.; GILLIS, P. L.; WOOD, C. M.; O'DONNELL, M. J. Cadmium transport by the gut and Malpighian tubules of *Chironomus riparius*. **Aquatic Toxicology**, v. 92, n. 3, p. 179–186, 2009. DOI. 10.1016/j.aquatox.2009.01.011.

LOPEZ, A. R.; HESTERBERG, D. R.; FUNK, D. H.; BUCHWALTER, D. B. Bioaccumulation Dynamics of Arsenate at the Base of Aquatic Food Webs. **Environmental Science and Technology**, v. 50, n. 12, p. 6556–6564, 2016. DOI. 10.1021/acs.est.6b01453.

MATHIEU-DENONCOURT, J.; WALLACE, S. J.; DE SOLLA, S. R.; LANGLOIS, V. S. Plasticizer endocrine disruption: Highlighting developmental and reproductive effects in mammals and non-mammalian aquatic species. **General and Comparative Endocrinology**, v. 219, n. 1, p. 74–88, 2015. DOI. 10.1016/j.ygcen.2014.11.003.

MEYER, J.; SCHMIDT, A.; MICHALKE, K.; HENSEL, R. Volatilisation of metals and metalloids by the microbial population of an alluvial soil. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 229–238, abr. 2007. DOI. 10.1016/J.SYAPM.2006.05.001.

MIREJI, P. O.; KEATING, J.; HASSANALI, A.; IMPOINVIL, D. E.; MBOGO, C. M.; MUTURI, M. N.; NYAMBAKA, H.; GITHURE, J. I.; BEIER, J. C.; KENYA, E. U.; GITHURE, J. I.; BEIER, J. C. Expression of metallothionein and alpha-tubulin in heavy metal-tolerant *Anopheles gambiae* sensu stricto (Diptera: Culicidae). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 73, n. 1, p. 46–50, jan. 2010. DOI. 10.1016/j.ecoenv.2009.08.004.

MIREJI, P. O.; KEATING, J.; HASSANALI, A.; MBOGO, C. M.; MUTURI, M. N.; GITHURE, J. I.; BEIER, J. C. Biological cost of tolerance to heavy metals in the mosquito *Anopheles gambiae*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 24, n. 2, p. 101–107, 2011. DOI. 10.1111/j.1365-2915.2010.00863.x.Biological.

MIREJI, P. O.; KEATING, J.; MBOGO, C.; NYAMBAKA, H.; OSIR, E.; GITHURE, J.; BEIER, J. Differential induction of proteins in *Anopheles gambiae* sensu stricto (Diptera:

Culicidae) larvae in response to heavy metal selection. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 26, n. 4, p. 214–226, 2006. DOI. 10.1017/S1742758406658955.

MOGREN, C. L.; VON KIPARSKI, G. R.; PARKER, D. R.; TRUMBLE, J. T. Survival, reproduction, and arsenic body burdens in *Chironomus riparius* exposed to arsenate and phosphate. **Science of the Total Environment**, v. 425, p. 60–65, 2012. DOI. 10.1016/j.scitotenv.2012.03.009.

MOGREN, C. L.; WALTON, W. E.; PARKER, D. R.; TRUMBLE, J. T. Trophic Transfer of Arsenic from an Aquatic Insect to Terrestrial Insect Predators. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 2–7, 2013. DOI. 10.1371/journal.pone.0067817.

MOGREN, C. L.; WALTON, W. E.; TRUMBLE, J. T. Tolerance to individual and joint effects of arsenic and *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis or *Lysinibacillus sphaericus* in *Culex* mosquitoes. **Insect Science**, v. 21, n. 4, p. 477–485, 2014. DOI. 10.1111/1744-7917.12046.

MORAIS, G. dos S.; PESENTI, E. C.; CESTARI, M. M.; NAVARRO-SILVA, M. A. Genotoxic effect of Phenanthrene on *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae). **Zoologia**, v. 31, n. 4, p. 323–328, 2014. DOI. 10.1590/s1984-46702014000400003.

MURUGAN, K. et al. Carbon and silver nanoparticles in the fight against the filariasis vector *Culex quinquefasciatus*: genotoxicity and impact on behavioral traits of non-target aquatic organisms. **Parasitology Research**, v. 115, n. 3, p. 1071–1083, mar. 2016. DOI. 10.1007/s00436-015-4837-9.

NIKOLIĆ, T. V.; PURAĆ, J.; ORČIĆ, S.; KOJIĆ, D.; VUJANOVIĆ, D.; STANIMIROVIĆ, Z.; GRŽETIĆ, I.; ILIJEVIĆ, K.; ŠIKOPARIJA, B.; BLAGOJEVIĆ, D. P. Environmental Effects on Superoxide Dismutase and Catalase Activity and Expression in Honey Bee. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 90, n. 4, p. 181–194, 2015. DOI. 10.1002/arch.21253.

OBERHOLSTER, P. J.; MUSEE, N.; BOTHA, A. M.; CHELULE, P. K.; FOCKE, W. W.; ASHTON, P. J. Assessment of the effect of nanomaterials on sediment-dwelling invertebrate *Chironomus tentans* larvae. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 74, n. 3, p. 416–423, mar. 2011. DOI. 10.1016/j.ecoenv.2010.12.012.

PANG, Y.-P.; BRIMIJOIN, S.; RAGSDALE, D. W.; ZHU, K. Y.; SURANYI, R. Novel and Viable Acetylcholinesterase Target Site for Developing Effective and Environmentally Safe Insecticides. **Current Drug Targets**, v. 13, p. 471–482, 2012. DOI. 10.2174/138945012799499703.

PEREZ, M. H.; NORIEGA, F. G. Sub-lethal metal stress response of larvae of *Aedes aegypti*. **Physiological Entomology**, v. 39, n. 2, p. 111–119, jun. 2014. DOI. 10.1111/phen.12054.

PIERART, A.; DUMAT, C.; MAES, A. Q. M.; SEJALON-DELMAS, N. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on antimony phyto-uptake and compartmentation in vegetables cultivated in urban gardens. **Chemosphere**, v. 191, p. 272–279, 2018. DOI. 10.1016/j.chemosphere.2017.10.058.

POUPARDIN, R.; REYNAUD, S.; STRODE, C.; RANSON, H.; VONTAS, J. G.; DAVID, J.-P. Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: impact on larval tolerance to chemical insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 5, p. 540–551, maio 2008. DOI. 10.1016/j.ibmb.2008.01.004.

POWELL, J. R.; EVANS, B. R. How Much Does Inbreeding Reduce Heterozygosity? Empirical Results from *Aedes aegypti*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 1, p. 157–158, 2017. DOI. 10.4269/ajtmh.16-0693.

PRUD'HOMME, S. M.; CHAUMOT, A.; CASSAR, E.; DAVID, J.-P.; REYNAUD, S. Impact of micropollutants on the life-history traits of the mosquito *Aedes aegypti*: On the relevance of transgenerational studies. **Environmental Pollution**, v. 220, n. 1, p. 242–254, 2017. DOI. 10.1016/j.envpol.2016.09.056.

RAYMS-KELLER, A.; OLSON, K. E.; MCGAW, M.; ORAY, C.; CARLSON, J. O.; BEATY, B. J. Effect of Heavy Metals on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Larvae. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 47, n. 39, p. 41–47, 1998.

ROSS, P. A.; ENDERSBY-HARSHMAN, N. M.; HOFFMANN, A. A. A comprehensive assessment of inbreeding and laboratory adaptation in *Aedes aegypti* mosquitoes. **Evolutionary Applications**, v. bioRxiv 23, 2017. DOI. 10.1111/eva.12740.

SARKAR, S.; DUTTAGUPTA, A. K.; MAL, T. K. Effects of heavy metals on population growth and metallothionein gene expression in the mosquito *Culex quinquefasciatus*, from Calcutta, India. **Environmental Pollution**, v. 127, n. 2, p. 183–193, jan. 2004. DOI. 10.1016/j.envpol.2003.08.005.

TELFORD, K.; MAHER, W.; KRIKOWA, F.; FOSTER, S.; ELLWOOD, M. J.; ASHLEY, P. M.; LOCKWOOD, P. V.; WILSON, S. C. Bioaccumulation of antimony and arsenic in a highly contaminated stream adjacent to the Hillgrove Mine, NSW, Australia. **Environmental Chemistry**, v. 6, n. 2, p. 133, 2009. DOI. 10.1071/EN08097.

THOMSON, D.; MAHER, W.; FOSTER, S. Arsenic and selected elements in inter-tidal and estuarine marine algae, south-east coast, NSW, Australia. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 21, n. 1, p. 396–411, 2007. DOI. 10.1002/aoc.1231.

U.S.EPA. **The Work Plan Chemical Risk Assessment for Antimony Trioxide (ATO)** Washington, DC United States Environmental Protection Agency, 2014.

U.S.EPA. **Antimony trioxide**.

VALLE, D.; MONTELLA, I. R. Quantification methodology for enzyme activity related to insecticide resistance in *Aedes aegypti*. **Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 1, p. 128, 2006.

WANG, X.; HE, M.; XI, J.; LU, X. Antimony distribution and mobility in rivers around the world's largest antimony mine of Xikuangshan, Hunan Province, China. **Microchemical Journal**, v. 97, n. 1, p. 4–11, 2011. DOI. 10.1016/j.microc.2010.05.011.

WARNKEN, J.; OHLSSON, R.; WELSH, D. T.; TEASDALE, P. R.; CHELSKY, A.; BENNETT, W. W. Antimony and arsenic exhibit contrasting spatial distributions in the sediment and vegetation of a contaminated wetland. **Chemosphere**, v. 180, p. 388–395, 2017. DOI. 10.1016/j.chemosphere.2017.03.142.

WHO. **Guidelines for Drinking-Water Quality**.

WILSON, S. C.; LOCKWOOD, P. V.; ASHLEY, P. M.; TIGHE, M. The chemistry and behaviour of antimony in the soil environment with comparisons to arsenic: A critical review. **Environmental Pollution**, v. 158, n. 5, p. 1169–1181, 2010. DOI. 10.1016/j.envpol.2009.10.045.

XI, J.; HE, M.; WANG, P. Adsorption of Antimony on Sediments from Typical Water Systems in China: A Comparison of Sb(III) and Sb(V) Pattern. **Soil and Sediment**

Contamination, v. 23, n. 1, p. 37–48, 2013. DOI. 10.1080/15320383.2013.774319.

YUAN, C.; LU, X.; QIN, J. I. E.; ROSEN, B. P.; LE, X. C. Volatile Arsenic Species Released from *Escherichia coli* Expressing the AsIII S-adenosylmethionine Methyltransferase Gene. **Environmental Science and Tecnology**, v. 42, n. 9, p. 3201–3206, 2008. DOI. 10.1021/es702910g.

ZELLER, M.; KOELLA, J. C. Effects of food variability on growth and reproduction of *Aedes aegypti*. **Ecology and Evolution**, v. 6, n. 2, p. 552–559, 2016. DOI. 10.1002/ece3.1888.

ZENG, D.; ZHOU, S.; REN, B.; CHEN, T. Bioaccumulation of Antimony and Arsenic in Vegetables and Health Risk Assessment in the Superlarge Antimony-Mining Area, China. **Journal of analytical methods in chemistry**, v. 2015, p. 909724, 2015. DOI. 10.1155/2015/909724.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo traz novas contribuições sobre o modo de ação do butil benzil ftalato e do antimônio, sendo possível verificar o impacto de concentrações ambientalmente relevantes dos poluentes em diferentes tempos de exposição sobre a resposta ao estresse, o metabolismo e a biologia de *A. aegypti*, mostrando que a espécie pode ser utilizada como modelo em estudos ecotoxicológicos.

As vias de detoxificação de fases I e II e o biomarcador de neurotoxicidade não responderam ao estresse causado pela exposição ao antimônio, havendo ativação apenas das enzimas de defesa antioxidante, indicando a ocorrência de estresse oxidativo.

Os resultados da exposição crônica ao BBP demonstraram efeitos da poluição ambiental sobre a espécie ao observarmos a redução da mortalidade durante o desenvolvimento, aumento no tamanho das asas das fêmeas e redução do ciclo de vida. A exposição crônica ao antimônio provocou altas taxa de sobrevivência de larvas que chegaram à fase adulta e a maior quantidade fêmeas emergidas. Estes fatores positivos encontrados para ambos os compostos podem alterar a dinâmica populacional e melhorar a capacidade vetorial da espécie, consequentemente, levando a implicações na transmissão de agente etiológicos pelo *A. aegypti*.

A quantificação das concentrações de antimônio demonstrou que este ocasionou efeitos tóxicos em concentrações iguais ou abaixo do limite de 0,005 mg.L estabelecido pela resolução do CONAMA (2005).

Os dados obtidos sobre os parâmetros biológicos sugerem a necessidade de um estudo de ecotoxicidade transgeracional para acompanhar o ciclo de vida completo e os efeitos na prole, a fim de confirmar os efeitos dos poluentes na história de vida da espécie e obter resultados mais concretos a nível populacional.

REFERÊNCIAS

- ABDEL DAIEM, M. M.; RIVERA-UTRILLA, J.; OCAMPO-PÉREZ, R.; MÉNDEZ-DÍAZ, J. D.; SÁNCHEZ-POLO, M. Environmental impact of phthalic acid esters and their removal from water and sediments by different technologies - A review. **Journal of Environmental Management**, v. 109, n. 1, p. 164–178, 2012. DOI. 10.1016/j.jenvman.2012.05.014.
- AKHTER, H.; MISYURA, L.; BUI, P.; DONINI, A. Salinity responsive aquaporins in the anal papillae of the larval mosquito, *Aedes aegypti*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 203, p. 144–151, 2017. DOI. 10.1016/j.cbpa.2016.09.008.
- AL-SHAMI, S. A.; RAWI, C. S. M.; AHMAD, A. H.; NOR, S. A. M. Genotoxicity of heavy metals to the larvae of *Chironomus kiiensis* Tokunaga after short-term exposure. **Toxicology and Industrial Health**, v. 28, n. 8, p. 734–739, out. 2011. DOI. 10.1177/0748233711422729.
- ALARABY, M.; ANNANGI, B.; HERNÁNDEZ, A.; CREUS, A.; MARCOS, R. A comprehensive study of the harmful effects of ZnO nanoparticles using *Drosophila melanogaster* as an in vivo model. **Journal of hazardous materials**, v. 296, n. 1, p. 166–174, out. 2015. DOI. 10.1016/j.jhazmat.2015.04.053.
- ANDERSON, C. G. The metallurgy of antimony. **Chemie der Erde**, v. 72, n. 4, p. 3–8, jul. 2012. DOI. 10.1016/j.chemer.2012.04.001.
- ARAMBOUROU, H.; BEISEL, J.-N.; BRANCHU, P.; DEBAT, V. Patterns of fluctuating asymmetry and shape variation in *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) exposed to nonylphenol or lead. **PloS one**, v. 7, n. 11, p. e48844, jan. 2012. DOI. 10.1371/journal.pone.0048844.
- ARAMBOUROU, H.; BEISEL, J.-N.; BRANCHU, P.; DEBAT, V. Exposure to sediments from polluted rivers has limited phenotypic effects on larvae and adults of *Chironomus riparius*. **The Science of the Total Environment**, v. 484, n. 1, p. 92–101, jun. 2014. DOI. 10.1016/j.scitotenv.2014.03.010.
- ARIAS, A. R. L.; BUSS, D. F.; ALBURQUERQUE, C. de; INÁCIO, A. F.; FREIRE, M. M.; EGLER, M.; MUGNAI, R.; BAPTISTA, D. F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 61–72, 2007. DOI. 10.1590/S1413-81232007000100011.
- ARMBRUSTER, P.; HUTCHINSON, R. A. Pupal Mass and Wing Length as Indicators of Fecundity in *Aedes albopictus* and *Aedes geniculatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 39, n. 4, p. 699–704, 2002. DOI. 10.1603/0022-2585-39.4.699.
- AZQUETA, A.; GUTZKOW, K. B.; BRUNBORG, G.; COLLINS, A. R. Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 724, n. 1–2, p. 41–45, 2011a. DOI. 10.1016/j.mrgentox.2011.05.010.
- AZQUETA, A.; MEIER, S.; PRIESTLEY, C.; GUTZKOW, K. B.; BRUNBORG, G.; COLLINS, A. The influence of scoring method on variability in results obtained with the

comet assay. **Mutagenesis**, v. 26, n. 3, p. 393–399, 2011b. DOI. 10.1093/mutage/geq105.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006. DOI. 10.1590/S0100-40422006000100021.

BARTLETT-HEALY, K.; UNLU, I.; OBENAUER, P.; HUGHES, T.; HEALY, S.; CREPEAU, T.; FARAJOLLAHI, A.; KESAVARAJU, B.; FONSECA, D.; SCHOELER, G.; GAUGLER, R.; STRICKMAN, D. A. Larval Mosquito Habitat Utilization and Community Dynamics of *Aedes albopictus* and *Aedes japonicus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 49, n. 4, p. 813–824, 2012. DOI. 10.1603/me11031.

BEDHOMME, S.; AGNEW, P.; SIDOBRE, C.; MICHALAKIS, Y. Sex-specific reaction norms to intraspecific larval competition in the mosquito *Aedes aegypti*. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 16, n. 4, p. 721–730, 2003. DOI. 10.1046/j.1420-9101.2003.00576.x.

BEYERSMANN, D.; HARTWIG, A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. **Archives of Toxicology**, v. 82, n. 8, p. 493–512, ago. 2008. DOI. 10.1007/s00204-008-0313-y.

BHINDER, P.; CHAUDHRY, A. Evaluation of toxic potential of acephate and chlorpyrifos by dominant lethal test on *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Environmental Biology**, v. 34, n. 1, p. 573–577, 2013.

BHINDER, P.; CHAUDHRY, A.; KUMAR, R.; KAUR, R. Dominant lethal test based genotoxicity evaluation of propoxur and methyl parathion in *Culex quinquefasciatus*. **International Journal of Pharmaceutical Research and Bio-Science**, v. 1, n. 6, p. 112–122, 2012.

BILAL, M.; RASHEED, T.; SOSA-HERNÁNDEZ, J. E.; RAZA, A.; NABEEL, F.; IQBAL, H. M. N. Biosorption: An interplay between marine algae and potentially toxic elements - A review. **Marine Drugs**, v. 16, n. 2, p. 1–16, 2018. DOI. 10.3390/md16020065.

BIRKETT, J. W.; LESTER, J. N. **Endocrine disruptors in wastewater and sludge treatment processes**. Lewis Pub, 2003.

BLACKMORE, M. S.; LORD, C. C. The relationship between size and fecundity in *Aedes albopictus*. **Journal of Vector Ecology**, v. 25, n. 2, p. 212–217, dez. 2000.

BONO-BLAY, F.; GUART, A.; FUENTE, B.; PEDEMONTE, M.; PASTOR, M. C.; BORRELL, A.; LACORTE, S. Survey of phthalates, alkylphenols, bisphenol A and herbicides in Spanish source waters intended for bottling. **Environmental science and pollution research international**, v. 19, n. 8, p. 3339–3349, set. 2012. DOI. 10.1007/s11356-012-0851-y.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248–254, maio 1976. DOI. 10.1006/abio.1976.9999.

BRADY, O. J.; JOHANSSON, M. A.; GUERRA, C. A.; BHATT, S.; GOLDING, N.; PIGOTT, D. M.; DELATTE, H.; GRECH, M. G.; LEISNHAM, P. T.; MACIEL-DE-FREITAS, R.; STYER, L. M.; SMITH, D. L.; SCOTT, T. W.; GETHING, P. W.; HAY, S. I. Modelling adult *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* survival at different temperatures

in laboratory and field settings. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 351, p. 1–12, 2013. DOI. 10.1186/1756-3305-6-351.

BRAECKMAN, B. P.; RAES, H.; HOYE, D. Van. Heavy-metal toxicity in an insect cell line. Effects of cadmium chloride, mercuric chloride and methylmercuric chloride on cell viability and proliferation in *Aedes albopictus* cells. **Cell Biology and Toxicology**, v. 13, p. 389–397, 1997.

BRAECKMAN, B. P.; SIMOENS, C.; RZEZNIK, U.; RAES, H. Effect of sublethal doses of Cadmium, Inorganic Mercury and Methylmercury on the cell morphology of an insect cell line (*Aedes albopictus*, C6/36). **Cell Biology International**, v. 21, n. 12, p. 823–832, 1997.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, p. 279–293, 2007. DOI. 10.5123/s1679-49742007000400006.

BRIEGEL, H. Metabolic relationship between female body size, reserves, and fecundity of *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**, v. 36, n. 3, p. 165–172, jan. 1990. DOI. 10.1016/0022-1910(90)90118-Y.

CACCIATORE, L. C.; GUERRERO, N. V.; COCHÓN, A. C. Cholinesterase and carboxylesterase inhibition in *Planorbarius corneus* exposed to binary mixtures of azinphos-methyl and chlorpyrifos. **Aquatic Toxicology**, v. 128–129, n. 1, p. 124–134, mar. 2013. DOI. 10.1016/j.aquatox.2012.12.005.

CALADO, S. L. M.; WOJCIECHOWSKI, J.; SANTOS, G. S.; MAGALHÃES, V. F.; PADIAL, A. A.; CESTARI, M. M.; SILVA DE ASSIS, H. C. Neurotoxins in a water supply reservoir: An alert to environmental and human health. **Toxicon**, v. 126, p. 12–22, 2017. DOI. 10.1016/j.toxicon.2016.12.002.

CALL, D. J.; MARKEE, T. P.; GEIGER, D. L.; BROOKE, L. T.; VANDEVENTER, F. A.; COX, D. A.; GENISOT, K. I.; ROBILLARD, K. A.; GORSUCH, J. W.; PARKERTON, T. F.; REILEY, M. C.; ANKLEY, G. T.; MOUNT, D. R. An assessment of the toxicity of phthalate esters to freshwater benthos. 1. Aqueous exposures. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, n. 8, p. 1798–1804, 2001. DOI. 10.1002/etc.5620200826.

CARMONA, E. R.; INOSTROZA-BLANCHETEAU, C.; OBANDO, V.; RUBIO, L.; MARCOS, R. Genotoxicity of copper oxide nanoparticles in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v. 791, n. 1, p. 1–11, set. 2015. DOI. 10.1016/j.mrgentox.2015.07.006.

CARRON, A. Correlation between wing measurements and dry body weight in male and female *Ochlerotatus (Ochlerotatus) caspius* (Pallas, 1771) (Diptera: Culicidae). **European Mosquito Bulletin**, v. 24, n. 1, p. 4–8, 2007.

CHOI, J. Ecotoxicological Biomonitoring at Different Levels of Biological Organization and Its Application in *Chironomus spp.* **Journal of Environmental Toxicology**, v. 20, n. 1, p. 1–11, 2005.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 249–261, 2004. DOI. 10.1385/MB:26:3:249.

CONAMA. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005.**

CONAMA. **Resolução nº 452, de 02 de julho de 2012.**

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008. DOI. 10.1590/s0100-40422008000700038.

COURET, J.; BENEDICT, M. Q. A meta-analysis of the factors influencing development rate variation in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **BMC Ecology**, v. 14, n. 3, p. 1–15, jan. 2014. DOI. 10.1186/1472-6785-14-3.

CUNHA, I.; MANGAS-RAMIREZ, E.; GUILHERMINO, L. Effects of copper and cadmium on cholinesterase and glutathione S-transferase activities of two marine gastropods (*Monodonta lineata* and *Nucella lapillus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 145, n. 4, p. 648–657, 2007. DOI. 10.1016/j.cbpc.2007.02.014.

CUVILLIER-HOT, V.; SALIN, K.; DEVERS, S.; TASIEMSKI, A.; SCHAFFNER, P.; BOULAY, R.; BILLIARD, S.; LENOIR, A. Impact of ecological doses of the most widespread phthalate on a terrestrial species, the ant *Lasius niger*. **Environmental research**, v. 131, n. 1, p. 104–110, maio 2014. DOI. 10.1016/j.envres.2014.03.016.

DEMIR, E.; AKSAKAL, S.; TURNA, F.; KAYA, B.; MARCOS, R. *In vivo* genotoxic effects of four different nano-sizes forms of silica nanoparticles in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 283, n. 1, p. 260–266, jan. 2015. DOI. 10.1016/j.jhazmat.2014.09.029.

DEVICARI, M.; LOPES, A. R.; SUESDEK, L. Dimorfismo sexual alar em *Aedes scapularis* (Diptera: Culicidae). **Biota Neotropica**, v. 11, n. 2, p. 1–5, 2011. DOI. 10.1590/s1676-06032011000200016.

DHIVYA, R.; MANIMEGALAI, K. Wing Shape Analysis of the *Japanese encephalitis* vector *Culex gelidus* (Diptera: Culicidae) at the Foot Hill of Southern Western Ghats, India. **World Journal of Zoology**, v. 8, n. 1, p. 119–125, 2013. DOI. 10.5829/idosi.wjz.2013.8.1.7277.

DIZER, H.; SILVA-DE-ASSIS, H. C.; HANSEN, P. D. Cholinesterase activity as a bioindicator for monitoring marine pollution in the Baltic Sea and the Mediterranean Sea. In: **Biomarkers in Marine Organisms: a practical approach**. p. 331–342.

DOM, N. C.; AHMAD, P.; AZMAN, M.; MOKHTAR, M. Assessment of heavy metal concentration on *Aedes* mosquito breeding sites in urban area, Malaysia. **International Journal of Mosquito Research**, v. 4, n. 2, p. 12–19, 2017.

DUA, V. K.; KUMAR, A.; PANDEY, A. C.; KUMAR, S. Insecticidal and genotoxic activity of *Psoralea corylifolia* Linn. (Fabaceae) against *Culex quinquefasciatus* Say, 1823. **Parasites & vectors**, v. 6, n. 1, p. 30, jan. 2013. DOI. 10.1186/1756-3305-6-30.

DURAN, M.; KARA, Y.; AKYILDIZ, G. K.; OZDEMIR, A. Antimony and heavy metals accumulation in some macroinvertebrates in the Yesilirmak River (N Turkey) near the Sb-mining area. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 78, n. 5, p. 395–399, 2007. DOI. 10.1007/s00128-007-9183-x.

ECHA. **Candidate List of substances of very high concern for Authorisation**Helsinki, FinlandEuropean Chemicals Agency, 2016.

EL-SHEIKH, T. M. Y.; FOUHA, M. A.; HASSAN, M. I.; ABD-ELGHAPHAR, A.-E. A.; HASABALLAH, A. I. Toxicological Effects of Some Heavy Metal Ions on *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). **Egyptian Academic Journal of Biological Science**, v. 2, n. 1, p. 63–76, 2010. DOI. 10.21608/eajbsf.2010.17465.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES JR, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 1, p. 88–95, 1961. DOI. 10.1016/0006-2952(61)90145-9.

ENAYATI, A. A.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. **Insect Molecular Biology**, v. 14, n. 1, p. 3–8, jan. 2005. DOI. 10.1111/j.1365-2583.2004.00529.x.

FERREIRA, S. L. C.; SANTOS, W. N. L.; SANTOS, I. F.; JUNIOR, M. M. S.; SILVA, L. O. B.; BARBOSA, U. A.; SANTANA, F. A.; QUEIROZ, A. F. S. Strategies of sample preparation for speciation analysis of inorganic antimony using hydride generation atomic spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 114, n. 1, p. 22–31, 2014. DOI. 10.1016/j.microc.2013.11.019.

FLORA, S. J. S. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, n. 4, p. 191–206, 2009. DOI. 10.4161/oxim.2.4.9112.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. 1. ed. São Paulo: EDUSP, 1996.

FORGET, J.; PAVILLON, J.-F.; BELIAEFF, B.; BOCQUENÉ, G. Joint action of pollutant combinations (pesticides and metals) on survival (LC50 values) and acetylcholinesterase activity of *Tigriopus brevicornis* (Copepoda, Harpacticoida). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 5, p. 912–918, 1999. DOI. 10.1002/etc.5620180514.

FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; LYONS, B. P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutation Research**, v. 681, n. 1, p. 80–92, 2009. DOI. 10.1016/j.mrrev.2008.03.001.

FU, Z.; WU, F.; MO, C.; DENG, Q.; MENG, W.; GIESY, J. P. Comparison of arsenic and antimony biogeochemical behavior in water, soil and tailings from Xikuangshan, China. **Science of the Total Environment**, v. 539, p. 97–104, 2016. DOI. 10.1016/j.scitotenv.2015.08.146.

GALLOWAY, T. S. Biomarkers in environmental and human health risk assessment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 53, n. 1, p. 606–613, 2006. DOI. 10.1016/j.marpolbul.2006.08.013.

GANESAN, P.; STALIN, A.; GABRIEL PAULRAJ, M.; BALAKRISHNA, K.; IGNACIMUTHU, S.; ABDULLAH AL-DHABI, N. Biocontrol and non-target effect of fractions and compound isolated from *Streptomyces rimosus* on the immature stages of filarial vector *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) and the compound interaction with Acetylcholinesterase. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 161, n. 1, p. 120–128, 2018. DOI. 10.1016/j.ecoenv.2018.05.061.

GAO, R.; YUAN, Z.; ZHAO, Z.; GAO, X. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 45, n. 1, p. 41–45, 1998. DOI. 10.1016/s0302-4598(98)00072-5.

GARMENDIA, L.; IZAGIRRE, U.; CAJARAVILLE, M. P.; MARIGÓMEZ, I. Application of a battery of biomarkers in mussel digestive gland to assess long-term effects of the Prestige oil spill in Galicia and the Bay of Biscay: Lysosomal responses. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, n. 4, p. 901–914, 2011. DOI. 10.1039/c0em00409j.

GEBEL, T. Arsenic and antimony: comparative approach on mechanistic toxicology. **Chemico-Biological Interactions**, v. 107, n. 3, p. 131–144, nov. 1997. DOI. 10.1016/S0009-2797(97)00087-2.

GEISSEN, V.; MOL, H.; KLUMPP, E.; UMLAUF, G.; NADAL, M.; VAN DER PLOEG, M.; VAN DE ZEE, S. E. A. T. M.; RITSEMA, C. J. Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management. **International Soil and Water Conservation Research**, v. 3, n. 1, p. 57–65, 2015. DOI. 10.1016/j.iswcr.2015.03.002.

GEYER, R.; JAMBECK, J. R.; LAW, K. L. Production, use, and fate of all plastics ever made. **Science Advances**, v. 3, n. e1700782, p. 1–5, 2017. DOI. 10.1126/sciadv.1700782.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 695–706, 2007.

GILLIS, P. L.; WOOD, C. M. The effect of extreme waterborne cadmium exposure on the internal concentrations of cadmium, calcium, and sodium in *Chironomus riparius* larvae. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, n. 1, p. 56–64, 2008. DOI. 10.1016/j.ecoenv.2007.08.003.

GOMES, A. D. C. Medidas dos níveis de infestação urbana para *Aedes (Stegomyia) aegypti* e *Aedes (stegomyia) albopictus* em Programa de Vigilância Entomológica. **Informe Epidemiológico do Sus (IESUS)**, v. 7, n. 3, p. 49–57, set. 1998. DOI. 10.5123/S0104-16731998000300006.

GOMES, A. dos S.; SCIAVICO, C. J. de S.; EIRAS, Á. E. Periodicidade de oviposição de fêmeas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) em laboratório e campo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 4, p. 327–332, 2006. DOI. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822006000400002>.

GUBLER, D. J.; CLARK, G. G. Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever: The emergence of a global health problem. **Emerging Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, p. 55–57, 1995.

HALDEN, R. U. Plastics and Health Risks. **Annual Review of Public Health**, v. 31, n. 1, p. 179–194, 2010. DOI. 10.1055/s-2004-832376.

HASSAN, M. I.; HASABALLAH, A. Histopathological effect of certain heavy metals on the mosquito vector *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). **Al-Azhar Bulletin of Science**, v. 22, n. 1, p. 69–83, 2011. DOI. 10.21608/absb.2011.7036.

HEMINGWAY, J. (ed.). **Techniques to detect insecticide resistance mechanisms (field and laboratory manual)**. World Health Organization, 1998. v. 6

HERRERO, Ó.; PLANELLÓ, R.; AQUILINO, M.; MORCILLO, G. Evaluación de los efectos tóxicos de ftalatos sobre poblaciones naturales de *Chironomus riparius* (Diptera): implicaciones en estudios de ecotoxicidad. **Revista de Toxicología**, v. 31, n. 2, p. 176–186, 2014.

HERRERO, Ó.; PLANELLÓ, R.; MORCILLO, G. The plasticizer benzyl butyl phthalate (BBP) alters the ecdysone hormone pathway, the cellular response to stress, the energy

metabolism, and several detoxication mechanisms in *Chironomus riparius* larvae. **Chemosphere**, v. 128, n. 1, p. 266–77, jun. 2015. DOI. 10.1016/j.chemosphere.2015.01.059.

HIEN, D. S. Biology of *Aedes aegypti* (L., 1762) and *Aedes albopictus* (Skuse, 1895) (Diptera, Culicidae). III. effect of certain environmental conditions on the development of larvae and pupae. **Acta Parasitologica Polonica**, v. 23, n. 46, p. 553–568, 1975.

HODKINSON, I. D.; JACKSON, J. K. Terrestrial and Aquatic Invertebrates as Bioindicators for Environmental Monitoring, with Particular Reference to Mountain Ecosystems. **Environmental Management**, v. 35, n. 5, p. 649–666, 2005. DOI. 10.1007/s00267-004-0211-x.

HOFFMANN, A. A.; WOODS, R. E.; COLLINS, E.; WALLIN, K.; WHITE, A.; MCKENZIE, J. A. Wing shape versus asymmetry as an indicator of changing environmental conditions in insects. **Australian Journal of Entomology**, v. 44, n. 3, p. 233–243, ago. 2005. DOI. 10.1111/j.1440-6055.2005.00469.x.

HOLMSTRUP, M.; BINDESBØL, A. M.; OOSTINGH, G. J.; DUSCHL, A.; SCHEIL, V.; KÖHLER, H. R.; LOUREIRO, S.; SOARES, A. M. V. M.; FERREIRA, A. L. G.; KIENLE, C.; GERHARDT, A.; LASKOWSKI, R.; KRAMARZ, P. E.; BAYLEY, M.; SVENDSEN, C.; SPURGEON, D. J. Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: A review. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 1, p. 3746–3762, 2010. DOI. 10.1016/j.scitotenv.2009.10.067.

HUBINGER, J. C. A survey of phthalate esters in consumer cosmetic products. **Journal of Cosmetic Science**, v. 61, n. 1, p. 457–465, 2010.

HUGO AEBI. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. 1947, p. 121–126, 1984. DOI. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).

HYNE, R. V.; MAHER, W. A. Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 54, n. 3, p. 366–374, mar. 2003. DOI. 10.1016/S0147-6513(02)00119-7.

IARC. **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**. Lyon, France, 2014.

INMETRO. **Portaria n. 563, de 29 de dezembro de 2016**, 2016.

JHA, A. N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 207–221, 2008. DOI. 10.1093/mutage/gen014.

JIANG, Z.-Y.; HUNT, J. V.; WOLFF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, v. 202, n. 2, p. 384–389, 1992. DOI. 10.1016/0003-2697(92)90122-n.

JIRAKANJANAKIT, N.; DUJARDIN, J. P. Discrimination of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) laboratory lines based on wing geometry. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 36, n. 4, p. 858–861, 2005.

JIRAKANJANAKIT, N.; LEEMINGSAWAT, S.; DUJARDIN, J. P. The geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti* in isofemale lines through successive generations. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, n. 4, p. 414–421, jul. 2008. DOI. 10.1016/j.meegid.2007.05.004.

JIRAKANJANAKIT, N.; LEEMINGSAWAT, S.; THONGRUNGKIAT, S.; APIWATHNASORN, C.; SINGHANIYOM, S.; BELLEC, C.; DUJARDIN, J. P. Influence of larval density or food variation on the geometry of the wing of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti*. **Tropical Medicine and International Health**, v. 12, n. 11, p. 1354–1360, 2007a. DOI. 10.1111/j.1365-3156.2007.01919.x.

JIRAKANJANAKIT, N.; LEEMINGSAWAT, S.; THONGRUNGKIAT, S.; APIWATHNASORN, C.; SINGHANIYOM, S.; BELLEC, C.; DUJARDIN, J. P. Influence of larval density or food variation on the geometry of the wing of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti*. **Tropical Medicine and International Health**, v. 12, n. 11, p. 1354–1360, nov. 2007b. DOI. 10.1111/j.1365-3156.2007.01919.x.

KIM, J. E.; BAE, Y. J.; LEE, H. G.; KIM, D. G. Analysis of habitat characteristics of mosquitoes in Danwon-gu, Ansan city, Korea, based on civil complaint data. **Entomological Research**, v. 48, n. 6, p. 540–549, 2018. DOI. 10.1111/1748-5967.12330.

KITVATANACHAI, S.; APIWATHNASORN, C.; LEEMINGSAWAT, S.; WONGWIT, W.; HJ, O. Lead levels of *Culex* mosquito larvae inhabiting lead utilizing factory. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 1, p. 64–68, 2011. DOI. 10.1016/S2221-1691(11)60070-1.

KITVATANACHAI, S.; APIWATHNASORN, C.; LEEMINGSAWAT, S.; WONGWIT, W.; TORNEE, S. Determination of lead toxicity in *Culex quinquefasciatus* mosquitoes in the laboratory. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 36, n. 4, p. 862–874, 2005.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T.; HAYASHY, M.; SOFUNY, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **Mammalian Mutagenicity**, v. 3, n. 1, p. 103–105, jan. 1995.

KOENRAADT, C. J. M.; KORMAKSSON, M.; HARRINGTON, L. C. Effects of inbreeding and genetic modification on *Aedes aegypti* larval competition and adult energy reserves. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 92, p. 1–11, 2010. DOI. 10.1186/1756-3305-3-92.

KOPPEN, G.; AZQUETA, A.; POURRUT, B.; BRUNBORG, G.; COLLINS, A. R.; LANGIE, S. A. S. The next three decades of the comet assay: a report of the 11th International Comet Assay Workshop. **Mutagenesis**, v. 32, n. 1, p. 397–408, 2017. DOI. 10.1093/mutage/gex002.

KUNO, G. Early History of Laboratory Breeding of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Focusing on the Origins and Use of Selected Strains. **Journal of Medical Entomology**, v. 47, n. 6, p. 957–971, 2010. DOI. 10.1603/ME10152.

LANG, G.-J.; YAN ZHU, K.; ZHANG, C.-X. Can Acetylcholinesterase Serve as a Target for Developing More Selective Insecticides? **Current Drug Targets**, v. 13, n. 4, p. 495–501, abr. 2012. DOI. 10.2174/138945012799499712.

LEE, S.-B.; CHOI, J. Multilevel evaluation of nonyphenol toxicity in fourth-instar larvae of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 11, p. 3006–3014, 2006. DOI. 10.1897/05-601r1.1.

LEISNHAM, P. T.; LOUNIBOS, L. P.; O'MEARA, G. F.; JULIANO, S. A. Interpopulation divergence in competitive interactions of the mosquito *Aedes albopictus*. **Ecology**, v. 90,

n. 9, p. 2405–2413, 2009. DOI. 10.1890/08-1569.1.

LENOIR, A.; CUVILLIER-HOT, V.; DEVERS, S.; CHRISTIDÈS, J.-P.; MONTIGNY, F. Ant cuticles: a trap for atmospheric phthalate contaminants. **The Science of the Total Environment**, v. 441, n. 1, p. 209–212, dez. 2012. DOI. 10.1016/j.scitotenv.2012.10.003.

LENOIR, A.; TOUCHARD, A.; DEVERS, S.; CHRISTIDÈS, J.-P.; BOULAY, R.; CUVILLIER-HOT, V. Ant cuticular response to phthalate pollution. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 1, p. 13446–13451, dez. 2014. DOI. 10.1007/s11356-014-3272-2.

LEONARD, E. M.; PIERCE, L. M.; GILLIS, P. L.; WOOD, C. M.; O'DONNELL, M. J. Cadmium transport by the gut and Malpighian tubules of *Chironomus riparius*. **Aquatic Toxicology**, v. 92, n. 3, p. 179–186, 2009. DOI. 10.1016/j.aquatox.2009.01.011.

LERTSIRISOPON, R.; SODA, S.; SEI, K.; IKE, M. Abiotic degradation of four phthalic acid esters in aqueous phase under natural sunlight irradiation. **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, n. 3, p. 285–290, 2009. DOI. 10.1016/S1001-0742(08)62265-2.

LIANG, D.-W.; ZHANG, T.; FANG, H. H. P.; HE, J. Phthalates biodegradation in the environment. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 80, n. 2, p. 183–198, ago. 2008. DOI. 10.1007/s00253-008-1548-5.

LIU, D.; PAN, L.; LI, Z.; CAI, Y.; MIAO, J. Metabolites analysis, metabolic enzyme activities and bioaccumulation in the clam *Ruditapes philippinarum* exposed to benzo[a]pyrene. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 107, n. 1, p. 251–259, 2014. DOI. 10.1016/j.ecoenv.2014.06.024.

LOPEZ, A. R.; HESTERBERG, D. R.; FUNK, D. H.; BUCHWALTER, D. B. Bioaccumulation Dynamics of Arsenate at the Base of Aquatic Food Webs. **Environmental Science and Technology**, v. 50, n. 12, p. 6556–6564, 2016. DOI. 10.1021/acs.est.6b01453.

LORENZ, C.; MARQUES, T. C.; SALLUM, M. A. M.; SUESDEK, L. Altitudinal population structure and microevolution of the malaria vector *Anopheles cruzii* (Diptera: Culicidae). **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 581, p. 1–12, 2014. DOI. 10.1186/s13071-014-0581-8.

LOVLEEN, M. Mutagenicity analysis of ethion using *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 7, p. 533–539, 2015.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO-FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 355–381, 2008. DOI. 10.4257/oeco.2008.1203.02.

MARTINE, B.; MARIE-JEANNE, T.; CENDRINE, D.; FABRICE, A.; MARC, C. Assessment of adult human exposure to phthalate esters in the urban centre of Paris (France). **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 90, n. 1, p. 91–96, jan. 2013. DOI. 10.1007/s00128-012-0859-5.

MARTÍNEZ-PAZ, P.; MORALES, M.; MARTÍNEZ-GUITARTE, J. L.; MORCILLO, G. Genotoxic effects of environmental endocrine disruptors on the aquatic insect *Chironomus riparius* evaluated using the comet assay. **Mutation Research**, v. 758, n.

1–2, p. 41–47, dez. 2013. DOI. 10.1016/j.mrgentox.2013.09.005.

MARTINS, A. J.; RIBEIRO, C. D. E. M.; BELLINATO, D. F.; PEIXOTO, A. A.; VALLE, D.; LIMA, J. B. P. Effect of insecticide resistance on development, longevity and reproduction of field or laboratory selected *Aedes aegypti* populations. **PloS one**, v. 7, n. 3, p. e31889, jan. 2012. DOI. 10.1371/journal.pone.0031889.

MATHIEU-DENONCOURT, J.; WALLACE, S. J.; DE SOLLA, S. R.; LANGLOIS, V. S. Plasticizer endocrine disruption: Highlighting developmental and reproductive effects in mammals and non-mammalian aquatic species. **General and Comparative Endocrinology**, v. 219, n. 1, p. 74–88, 2015. DOI. 10.1016/j.ygcen.2014.11.003.

MCCANN, S.; DAY, J. F.; ALLAN, S.; LORD, C. C. Age modifies the effect of body size on fecundity in *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Journal of Vector Ecology**, v. 34, n. 2, p. 174–181, 2009. DOI. 10.1111/j.1948-7134.2009.00024.x.

MEHDI, S. H.; QAMAR, A. Paraquat-induced ultrastructural changes and DNA damage in the nervous system is mediated via oxidative-stress-induced cytotoxicity in *Drosophila melanogaster*. **Toxicological Sciences**, v. 134, n. 2, p. 355–365, ago. 2013. DOI. 10.1093/toxsci/kft116.

MELA, M.; FILIPAK-NETO, F.; YAMAMOTO, F. Y.; ALMEIDA, R.; GROTZNER, S. R.; VENTURA, D. F.; RIBEIRO, C. A. de O.; NETO, F. F.; YAMAMOTO, F. Y.; ALMEIDA, R.; GRÖTZNER, S. R.; VENTURA, D. F.; DE OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Mercury distribution in target organs and biochemical responses after subchronic and trophic exposure to Neotropical fish *Hoplias malabaricus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 245–256, 2014. DOI. 10.1007/s10695-013-9840-4.

MEYER, J.; SCHMIDT, A.; MICHALKE, K.; HENSEL, R. Volatilisation of metals and metalloids by the microbial population of an alluvial soil. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 229–238, abr. 2007. DOI. 10.1016/J.SYAPM.2006.05.001.

MIHUCZ, V. G.; ZÁRAY, G. Occurrence of antimony and phthalate esters in polyethylene terephthalate bottled drinking water. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 51, n. 3, p. 183–209, 2016. DOI. 10.1080/05704928.2015.1105243.

MIREJI, P. O.; KEATING, J.; HASSANALI, A.; IMPOINVIL, D. E.; MBOGO, C. M.; MUTURI, M. N.; NYAMBAKA, H.; GITHURE, J. I.; BEIER, J. C.; KENYA, E. U.; GITHURE, J. I.; BEIER, J. C. Expression of metallothionein and alpha-tubulin in heavy metal-tolerant *Anopheles gambiae* sensu stricto (Diptera: Culicidae). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 73, n. 1, p. 46–50, jan. 2010. DOI. 10.1016/j.ecoenv.2009.08.004.

MIREJI, P. O.; KEATING, J.; HASSANALI, A.; MBOGO, C. M.; MUTURI, M. N.; GITHURE, J. I.; BEIER, J. C. Biological cost of tolerance to heavy metals in the mosquito *Anopheles gambiae*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 24, n. 2, p. 101–107, 2011. DOI. 10.1111/j.1365-2915.2010.00863.x.Biological.

MIREJI, P. O.; KEATING, J.; HASSANALI, A.; MBOGO, C. M.; NYAMBAKA, H.; KAHINDI, S.; JOHN C. Heavy metals in mosquito larval habitats in urban Kisumu and Malindi, Kenya, and their impact. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 70, n. 1, p. 147–153, 2008. DOI. 10.1016/j.ecoenv.2007.03.012.Heavy.

MIREJI, P. O.; KEATING, J.; MBOGO, C.; NYAMBAKA, H.; OSIR, E.; GITHURE, J.; BEIER, J. Differential induction of proteins in *Anopheles gambiae* sensu stricto (Diptera:

Culicidae) larvae in response to heavy metal selection. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 26, n. 4, p. 214–226, 2006. DOI. 10.1017/S1742758406658955.

MISHRA, M.; SHARMA, A.; SHUKLA, A. K.; KUMAR, R.; DWIVEDI, U. N.; KAR CHOWDHURI, D. Genotoxicity of dichlorvos in strains of *Drosophila melanogaster* defective in DNA repair. **Mutation Research**, v. 766, n. 1, p. 35–41, maio 2014. DOI. 10.1016/j.mrgentox.2014.02.004.

MOGREN, C. L.; VON KIPARSKI, G. R.; PARKER, D. R.; TRUMBLE, J. T. Survival, reproduction, and arsenic body burdens in *Chironomus riparius* exposed to arsenate and phosphate. **Science of the Total Environment**, v. 425, p. 60–65, 2012. DOI. 10.1016/j.scitotenv.2012.03.009.

MOGREN, C. L.; WALTON, W. E.; PARKER, D. R.; TRUMBLE, J. T. Trophic Transfer of Arsenic from an Aquatic Insect to Terrestrial Insect Predators. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 2–7, 2013. DOI. 10.1371/journal.pone.0067817.

MOGREN, C. L.; WALTON, W. E.; TRUMBLE, J. T. Tolerance to individual and joint effects of arsenic and *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis or *Lysinibacillus sphaericus* in *Culex mosquitoes*. **Insect Science**, v. 21, n. 4, p. 477–485, 2014. DOI. 10.1111/1744-7917.12046.

MOLINARI, G.; SOLONESKI, S.; REIGOSA, M. A.; LARRAMENDY, M. L. Genotoxic and cytotoxic in vitro evaluation of ivermectin and its formulation ivomec® on *Aedes albopictus* larvae (CCL-126™) cells. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 92, n. 8, p. 1577–1593, 2010. DOI. 10.1080/02772241003625284.

MONTELLA, I. R.; MARTINS, A. J.; VIANA-MEDEIROS, P. F.; LIMA, J. B. P.; BRAGA, I. A.; VALLE, D. The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance - A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 4, p. 437–449, 2012. DOI. 10.1590/s0074-02762012000400001.

MORAIS, G. dos S. **Avaliação do efeito da exposição de *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981 (Diptera: Chironomidae) a butil benzil ftalato e antimônio**. 2018. Universidade Federal do Paraná, 2018.

MORAIS, G. dos S.; PESENTI, E. C.; CESTARI, M. M.; NAVARRO-SILVA, M. A. Genotoxic effect of Phenanthrene on *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae). **Zoologia**, v. 31, n. 4, p. 323–328, 2014. DOI. 10.1590/s1984-46702014000400003.

MORAIS, G. dos S.; VIEIRA, T. B.; GUSTAVO SOUZA SANTOS; BAIKA, L. M.; CESTARI, M. M.; GRASSI, M. T.; NAVARRO-SILVA, M. A. Biological, biochemical and genotoxic effects of Sb in the midge *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981 (Diptera: Chironomidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2019.

MORI, A.; ROMERO-SEVERSON, J.; BLACK IV, W. C.; SEVERSON, D. W. Quantitative trait loci determining autogeny and body size in the Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*). **Heredity**, v. 101, n. 1, p. 75–82, 2008. DOI. 10.1038/hdy.2008.32.Quantitative.

MPHO, M.; HOLLOWAY, G. J.; CALLAGHAN, A. Fluctuating wing asymmetry and larval density stress in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 90, n. 1, p. 279–283, 2000. DOI. 10.1017/s0007485300000390.

MURUGAN, K. et al. Carbon and silver nanoparticles in the fight against the filariasis vector *Culex quinquefasciatus*: genotoxicity and impact on behavioral traits of non-target aquatic organisms. **Parasitology Research**, v. 115, n. 3, p. 1071–1083, mar. 2016. DOI. 10.1007/s00436-015-4837-9.

MUSASIA, F. K.; ISAAC, A. O.; MASIGA, D. K.; OMEDO, I. A.; MWAKUBAMBANYA, R.; OCHIENG, R.; MIREJI, P. O. Sex-specific induction of CYP6 cytochrome P450 genes in cadmium and lead tolerant *Anopheles gambiae*. **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, p. 97–101, 2013. DOI. 10.1186/1475-2875-12-97.

MUTURI, C. N.; RONO, M. K.; MASIGA, D. K.; WACHIRA, F. N.; OCHIENG, R.; MIREJI, P. O. Transcriptional responses of *Anopheles gambiae* s. s mosquito larvae to chronic exposure of cadmium heavy metal. **F1000 Research**, v. 6, n. 0, p. 2173, 2017. DOI. 10.12688/f1000research.13062.1.

NAIR, P. M. G.; PARK, S. Y.; LEE, S.-W. W.; CHOI, J. Differential expression of ribosomal protein gene, gonadotrophin releasing hormone gene and Balbiani ring protein gene in silver nanoparticles exposed *Chironomus riparius*. **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 1, p. 31–37, jan. 2011. DOI. 10.1016/j.aquatox.2010.08.013.

NICHOLLS, P. Classical catalase: Ancient and modern. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 525, n. 2, p. 95–101, 2012. DOI. 10.1016/j.abb.2012.01.015.

NIKOLIĆ, T. V.; PURAĆ, J.; ORČIĆ, S.; KOJIĆ, D.; VUJANOVIĆ, D.; STANIMIROVIĆ, Z.; GRŽETIĆ, I.; ILIJEVIĆ, K.; ŠIKOPARIJA, B.; BLAGOJEVIĆ, D. P. Environmental Effects on Superoxide Dismutase and Catalase Activity and Expression in Honey Bee. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 90, n. 4, p. 181–194, 2015. DOI. 10.1002/arch.21253.

OBERHOLSTER, P. J.; MUSEE, N.; BOTHA, A. M.; CHELULE, P. K.; FOCKE, W. W.; ASHTON, P. J. Assessment of the effect of nanomaterials on sediment-dwelling invertebrate *Chironomus tentans* larvae. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 74, n. 3, p. 416–423, mar. 2011. DOI. 10.1016/j.ecoenv.2010.12.012.

OEHLMANN, J.; SCHULTE-OEHLMANN, U.; KLOAS, W.; JAGNYTSCH, O.; LUTZ, I.; KUSK, K. O.; WOLLENBERGER, L.; SANTOS, E. M.; PAULL, G. C.; VAN LOOK, K. J. W.; TYLER, C. R. A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 364, n. 1, p. 2047–2062, jul. 2009. DOI. 10.1098/rstb.2008.0242.

PACKER, M. J.; CORBET, P. S. Size variation and reproductive success of female *Aedes punctator* (Diptera: Culicidae). **Ecological Entomology**, v. 14, n. 3, p. 297–309, ago. 1989. DOI. 10.1111/j.1365-2311.1989.tb00960.x.

PALAKSHA; SHAKUNTHALA, V. Variations in the esterase expression pattern with respect to different light regimes in *Drosophila agumbensis* and *Drosophila nagarholensis*. **Biological Rhythm Research**, v. 46, n. 4, p. 553–564, abr. 2015. DOI. 10.1080/09291016.2015.1026677.

PANG, Y.-P.; BRIMIJOIN, S.; RAGSDALE, D. W.; ZHU, K. Y.; SURANYI, R. Novel and Viable Acetylcholinesterase Target Site for Developing Effective and Environmentally Safe Insecticides. **Current Drug Targets**, v. 13, p. 471–482, 2012. DOI. 10.2174/138945012799499703.

PARK, K.; BANG, H. W.; PARK, J.; KWAK, I.-S. Ecotoxicological multilevel-evaluation

of the effects of fenbendazole exposure to *Chironomus riparius* larvae. **Chemosphere**, v. 77, n. 3, p. 359–67, out. 2009. DOI. 10.1016/j.chemosphere.2009.07.019.

PARK, K.; KWAK, I.-S. Molecular effects of endocrine-disrupting chemicals on the *Chironomus riparius* estrogen-related receptor gene. **Chemosphere**, v. 79, n. 9, p. 934–941, maio 2010. DOI. 10.1016/j.chemosphere.2010.03.002.

PARK, S. Y.; CHOI, J. Cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity assay using human cell and environmental species for the screening of the risk from pollutant exposure. **Environment International**, v. 33, n. 6, p. 817–822, ago. 2007. DOI. 10.1016/j.envint.2007.03.014.

PARK, S. Y.; CHOI, J. Genotoxic effects of nonylphenol and bisphenol A exposure in aquatic biomonitoring species: freshwater *Daphnia magna*, and aquatic midge, *Chironomus riparius*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 83, n. 4, p. 463–468, out. 2009. DOI. 10.1007/s00128-009-9745-1.

PEREZ, M. H.; NORIEGA, F. G. *Aedes aegypti* pharate 1st instar quiescence affects larval fitness and metal tolerance. **Journal of Insect Physiology**, v. 58, n. 1, p. 824–829, jun. 2012. DOI. 10.1016/j.jinsphys.2012.03.005.

PEREZ, M. H.; NORIEGA, F. G. Sub-lethal metal stress response of larvae of *Aedes aegypti*. **Physiological Entomology**, v. 39, n. 2, p. 111–119, jun. 2014. DOI. 10.1111/phen.12054.

PIERART, A.; DUMAT, C.; MAES, A. Q. M.; SEJALON-DELMAS, N. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on antimony phyto-uptake and compartmentation in vegetables cultivated in urban gardens. **Chemosphere**, v. 191, p. 272–279, 2018. DOI. 10.1016/j.chemosphere.2017.10.058.

PLANELLÓ, R.; HERRERO, Ó.; MARTÍNEZ-GUITARTE, J. L.; MORCILLO, G. Comparative effects of butyl benzyl phthalate (BBP) and di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on the aquatic larvae of *Chironomus riparius* based on gene expression assays related to the endocrine system, the stress response and ribosomes. **Aquatic Toxicology**, v. 105, n. 1–2, p. 62–70, set. 2011. DOI. 10.1016/j.aquatox.2011.05.011.

POUPARDIN, R.; REYNAUD, S.; STRODE, C.; RANSON, H.; VONTAS, J. G.; DAVID, J.-P. Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: impact on larval tolerance to chemical insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 5, p. 540–551, maio 2008. DOI. 10.1016/j.ibmb.2008.01.004.

POWELL, J. R.; EVANS, B. R. How Much Does Inbreeding Reduce Heterozygosity? Empirical Results from *Aedes aegypti*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 1, p. 157–158, 2017. DOI. 10.4269/ajtmh.16-0693.

POWELL, J. R.; TABACHNICK, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 1, p. 11–17, jan. 2013. DOI. 10.1590/0074-0276130395.

PRUD'HOMME, S. M.; CHAUMOT, A.; CASSAR, E.; DAVID, J.-P.; REYNAUD, S. Impact of micropollutants on the life-history traits of the mosquito *Aedes aegypti*: On the relevance of transgenerational studies. **Environmental Pollution**, v. 220, n. 1, p. 242–254, 2017. DOI. 10.1016/j.envpol.2016.09.056.

PRUD'HOMME, S. M.; RENAULT, D.; DAVID, J. P.; REYNAUD, S. Multiscale Approach to Deciphering the Molecular Mechanisms Involved in the Direct and Intergenerational Effect of Ibuprofen on Mosquito *Aedes aegypti*. **Environmental Science and Technology**, v. 52, n. 14, p. 7937–7950, 2018. DOI. 10.1021/acs.est.8b00988.

QU, R.; FENG, M.; SUN, P.; WANG, Z. A comparative study on antioxidant status combined with integrated biomarker response in *Carassius auratus* Fish exposed to nine phthalates. **Environmental Toxicology DOI**, v. 30, n. 10, p. 14247–14253, 2014. DOI. 10.1002/tox.

RAJAMANIKYAM, M.; VADLAPUDI, V.; PARVATHANENI, S. P.; KOUDE, D.; SRIPADI, P.; MISRA, S.; AMANCHY, R.; UPADHYAYULA, S. M. Isolation and characterization of phthalates from *brevibacterium mcbrellneri* that cause cytotoxicity and cell cycle arrest. **EXCLI Journal**, v. 16, p. 375–387, 2017. DOI. 10.17179/excli2017-145.

RAYMS-KELLER, A.; OLSON, K. E.; MCGAW, M.; ORAY, C.; CARLSON, J. O.; BEATY, B. J. Effect of Heavy Metals on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Larvae. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 47, n. 39, p. 41–47, 1998.

ROBERTS, D. Mosquito Larvae Change Their Feeding Behavior in Response to Kairomones From Some Predators. **Journal of Medical Entomology**, v. 51, n. 2, p. 368–374, 2014. DOI. 10.1603/ME13129.

ROSS, P. A.; ENDERSBY-HARSHMAN, N. M.; HOFFMANN, A. A. A comprehensive assessment of inbreeding and laboratory adaptation in *Aedes aegypti* mosquitoes. **Evolutionary Applications**, v. bioRxiv 23, 2017. DOI. 10.1111/eva.12740.

SANSEVERINO, A. M.; NESSIMIAN, J. L. Assimetria flutuante em organismos aquáticos e sua aplicação para avaliação de impactos ambientais. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 382–405, 2008. DOI. 10.4257/oeco.2008.1203.03.

SARKAR, S.; DUTTAGUPTA, A. K.; MAL, T. K. Effects of heavy metals on population growth and metallothionein gene expression in the mosquito *Culex quinquefasciatus*, from Calcutta, India. **Environmental Pollution**, v. 127, n. 2, p. 183–193, jan. 2004. DOI. 10.1016/j.envpol.2003.08.005.

SHI, H.; PEI, L.; GU, S.; ZHU, S.; WANG, Y.; ZHANG, Y.; LI, B. Glutathione S-transferase (GST) genes in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and comparative analysis with five additional insects. **Genomics**, v. 100, n. 5, p. 327–335, nov. 2012. DOI. 10.1016/j.ygeno.2012.07.010.

SIBLEY, P. K.; BENOIT, D. A.; ANKLEY, G. T. The significance of growth in *Chironomus tentans* sediment toxicity tests: relationship to reproduction and demographic endpoints. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 2, p. 336–345, 1997. DOI. 10.1002/etc.5620160232.

SIMOY, M. I.; SIMOY, M. V.; CANZIANI, G. A. The effect of temperature on the population dynamics of *Aedes aegypti*. **Ecological Modelling**, v. 314, n. 1, p. 100–110, 2015. DOI. 10.1016/j.ecolmodel.2015.07.007.

SINGHAL, S. S.; SINGH, S. P.; SINGHAL, P.; HORNE, D.; SINGHAL, J.; AWASTHI, S. Antioxidant role of glutathione S-transferases: 4-Hydroxynonenal, a key molecule in stress-mediated signaling. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 289, n. 3, p. 361–370, 2015. DOI. 10.1016/j.taap.2015.10.006.

SLICE, D. E. Landmark Coordinates Aligned by Procrustes Analysis Do Not Lie in Kendall's Shape Space. **Systematic Biology**, v. 50, n. 1, p. 141–149, 2001. DOI. 10.1080/10635150119110.

SONG, M. Y.; STARK, J. D.; BROWN, J. J. Comparative toxicity of four insecticides, including imidacloprid and tebufenozide, to four aquatic arthropods. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 12, p. 2494–2500, 1997. DOI. <https://doi.org/10.1002/etc.5620161209>.

SRIKANTH, K.; PEREIRA, E.; DUARTE, A. C.; AHMAD, I. Glutathione and its dependent enzymes' modulatory responses to toxic metals and metalloids in fish - a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 4, p. 2133–2149, 2013. DOI. 10.1007/s11356-012-1459-y.

STEPHENS, C. R.; JULIANO, S. A. Wing Shape as an Indicator of Larval Rearing Conditions for *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 49, n. 4, p. 927–938, 2012. DOI. 10.1603/me12012.

STRICKMAN, D. A.; KITTAYAPONG, P. Dengue and its vectors in Thailand: calculated transmission risk from total pupal counts of *Aedes aegypti* and association of wing-length measurements with aspects of the larval habitat. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 2, p. 209–217, 2003. DOI. 10.4269/ajtmh.2003.68.209.

TELFORD, K.; MAHER, W.; KRIKOWA, F.; FOSTER, S.; ELLWOOD, M. J.; ASHLEY, P. M.; LOCKWOOD, P. V.; WILSON, S. C. Bioaccumulation of antimony and arsenic in a highly contaminated stream adjacent to the Hillgrove Mine, NSW, Australia. **Environmental Chemistry**, v. 6, n. 2, p. 133, 2009. DOI. 10.1071/EN08097.

TETREAU, G.; CHANDOR-PROUST, A.; FAUCON, F.; STALINSKI, R.; AKHOUAYRI, I.; PRUD'HOMME, S. M.; RAVETON, M.; REYNAUD, S. Contrasting patterns of tolerance between chemical and biological insecticides in mosquitoes exposed to UV-A. **Aquatic Toxicology**, v. 140–141, p. 389–397, 2013. DOI. 10.1016/j.aquatox.2013.07.004.

THOMSON, D.; MAHER, W.; FOSTER, S. Arsenic and selected elements in inter-tidal and estuarine marine algae, south-east coast, NSW, Australia. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 21, n. 1, p. 396–411, 2007. DOI. 10.1002/aoc.1231.

U.S.EPA. **IRIS Toxicological Review of Butyl Benzyl Phthalate (BBP) (Preliminary Assessment Materials)** Washington, DC U.S. Environmental Protection Agency, 2014a.

U.S.EPA. **The Work Plan Chemical Risk Assessment for Antimony Trioxide (ATO)** Washington, DC United States Environmental Protection Agency, 2014b.

U.S.EPA. **Antimony trioxide.**

VALAVANIDIS, A.; VLAHOIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, n. 2, p. 178–189, 2006. DOI. 10.1016/j.ecoenv.2005.03.013.

VALLE, D.; MONTELLA, I. R. Quantification methodology for enzyme activity related to insecticide resistance in *Aedes aegypti*. **Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 1, p. 128, 2006.

VAREJÃO, J. B. M.; SANTOS, C. B.; REZENDE, H. R.; BEVILACQUA, L. C.;

FALQUETO, A. Criadouros de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) em bromélias nativas na cidade de Vitória, ES. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 3, p. 238–240, 2005. DOI. 10.1590/s0037-86822005000300006.

VICENTINI, M.; MORAIS, G. dos S.; REBECHI, D.; RICHARDI, V. S.; SANTOS, G. S.; CESTARI, M. M.; NAVARRO-SILVA, M. A. Benzo(a)pyrene Exposure Causes Genotoxic and Biochemical Changes in the Midge Larvae of *Chironomus sancticarloi* Strixino & Strixino (Diptera: Chironomidae). **Neotropical Entomology**, v. 46, n. 6, p. 658–665, 2017. DOI. 10.1007/s13744-017-0505-3.

VIDAL, P. O.; CARVALHO, E.; SUESDEK, L. Temporal variation of wing geometry in *Aedes albopictus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 8, p. 1030–1034, dez. 2012. DOI. 10.1590/s0074-02762012000800011.

WANG, J. X.; XI, Y. L.; HU, K.; LIU, X. B. Effect of butyl benzyl phthalate on life table-demography of two successive generations of cladoceran *Moina macrocopa* Straus. **Journal of Environmental Biology**, v. 32, n. 1, p. 17–22, 2011a.

WANG, W.; ZHANG, Y.; WANG, S.; FAN, C. Q.; XU, H. Distributions of phthalic esters carried by total suspended particulates in Nanjing, China. **Environmental monitoring and assessment**, v. 184, n. 11, p. 6789–6798, nov. 2012. DOI. 10.1007/s10661-011-2458-z.

WANG, X.; HE, M.; XI, J.; LU, X. Antimony distribution and mobility in rivers around the world's largest antimony mine of Xikuangshan, Hunan Province, China. **Microchemical Journal**, v. 97, n. 1, p. 4–11, 2011b. DOI. 10.1016/j.microc.2010.05.011.

WARNKEN, J.; OHLSSON, R.; WELSH, D. T.; TEASDALE, P. R.; CHELSKY, A.; BENNETT, W. W. Antimony and arsenic exhibit contrasting spatial distributions in the sediment and vegetation of a contaminated wetland. **Chemosphere**, v. 180, p. 388–395, 2017. DOI. 10.1016/j.chemosphere.2017.03.142.

WHO. **Guidelines for Drinking-Water Quality**.

WILSON, S. C.; LOCKWOOD, P. V.; ASHLEY, P. M.; TIGHE, M. The chemistry and behaviour of antimony in the soil environment with comparisons to arsenic: A critical review. **Environmental Pollution**, v. 158, n. 5, p. 1169–1181, 2010. DOI. 10.1016/j.envpol.2009.10.045.

XI, J.; HE, M.; WANG, P. Adsorption of Antimony on Sediments from Typical Water Systems in China: A Comparison of Sb(III) and Sb(V) Pattern. **Soil and Sediment Contamination**, v. 23, n. 1, p. 37–48, 2013. DOI. 10.1080/15320383.2013.774319.

YUAN, C.; LU, X.; QIN, J. I. E.; ROSEN, B. P.; LE, X. C. Volatile Arsenic Species Released from *Escherichia coli* Expressing the AsIII S-adenosylmethionine Methyltransferase Gene. **Environmental Science and Technology**, v. 42, n. 9, p. 3201–3206, 2008. DOI. 10.1021/es702910g.

ZELLER, M.; KOELLA, J. C. Effects of food variability on growth and reproduction of *Aedes aegypti*. **Ecology and Evolution**, v. 6, n. 2, p. 552–559, 2016. DOI. 10.1002/ece3.1888.

ZENG, D.; ZHOU, S.; REN, B.; CHEN, T. Bioaccumulation of Antimony and Arsenic in Vegetables and Health Risk Assessment in the Superlarge Antimony-Mining Area,

China. **Journal of analytical methods in chemistry**, v. 2015, p. 909724, 2015. DOI. 10.1155/2015/909724.

ZHOU, Q.; ZHANG, J.; FU, J.; SHI, J.; JIANG, G. Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. **Analytica Chimica Acta**, v. 606, n. 2, p. 135–150, jan. 2008. DOI. 10.1016/j.aca.2007.11.018.